

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología



**ESTUDIOS DE CEFDITOREN COMO MODELO DE
ACTUALIZACIÓN DE FARMACODINAMIA CONTINUA EN
LA ECOLOGÍA DE LA MICROBIOTA RESPIRATORIA
HUMANA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María Pilar Coronel Granado

Bajo la dirección del doctor

José Prieto Prieto

Madrid, 2012

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**



**Estudios de cefditoren como modelo de
actualización de farmacodinamia continua en la
ecología de la microbiota respiratoria humana.**

Tesis Doctoral

**María del Pilar Coronel Granado
Madrid, 2012**

Tesis Doctoral

Estudios de cefditoren como modelo de actualización de
farmacodinamia continua en la ecología de la microbiota
respiratoria humana

María del Pilar Coronel Granado

Director: Prof. Dr. D. José Prieto Prieto
Departamento de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
Madrid



DEPARTAMENTO DE MEDICINA
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
28040 MADRID

CERTIFICADO

José Prieto Prieto. Catedrático de Microbiología del Departamento de Medicina (Área Microbiología) de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid certifica que la memoria adjunta, titulada "ESTUDIOS DE CEFDITOREN COMO MODELO DE ACTUALIZACIÓN DE FARMACODINÁMICA CONTINUA EN LA ECOLOGÍA DE LA MICROBIOTA RESPIRATORIA HUMANA" ha sido realizada por María Pilar Coronel Granado bajo mi dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctora por la Universidad Complutense de Madrid.

Fdo.

José Prieto Prieto

Madrid, 16 de Febrero de 2012

A mi madre, por ser Pilar y ejemplo a seguir

Agradecimientos

Al Profesor D. José Prieto Prieto, en primer lugar, todo mi agradecimiento por sus oportunos consejos, ayuda, generosidad y por darme la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección

Al Dr. D. Lorenzo Aguilar Alfaro, por sus acertadas orientaciones, por su ilusión y trabajo constante y por enseñarme tanto sobre el apasionante mundo de los antibióticos y por su amistad

A la Dra. Dña. María José Giménez Mestre por su confianza, paciencia y por sus interesantes comentarios a esta tesis, o a los distintos estudios, a lo largo de su desarrollo y por su amistad

A la Dra. Dña. María Luisa Gómez Lus y a todo el departamento de Microbiología que ha colaborado, de una forma u otra, desde el inicio de esta tesis.

A todas las personas que citadas o no, han participado en los estudios realizados y han contribuido con su labor a esta tesis.

A D. Gonzalo Suárez Alba, por su revisión crítica de esta tesis en un campo tan alejado del suyo.

A mi familia por su apoyo continuo, especialmente a mis hijos Jaime y Claudia.

"The emergence of antibiotics resistance is the most eloquent example of Darwin's principle of evolution that there ever was"

"It is a war of attrition, it is naive to think we can win"

Dr. Livermore, Director Health Protection Agency. UK

"A shift in thinking is necessary. The focus should not solely be on finding new ways to combat bacteria but also on finding ways to combat antibiotics resistance directly"

Dr. Singleton, University of North Caroline. USA

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	10
1) DESARROLLO DE UN ANTIBIÓTICO	13
2) FARMACOEPIDEMIOLOGÍA DE LA RESISTENCIA.....	23
2.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	24
2.2 <i>Haemophilus influenzae</i>	29
2.3 <i>Streptococcus pyogenes</i>	34
3) FARMACODINAMIA	37
3.1 La farmacodinamia como predictor de eficacia.....	38
3.2 La farmacodinamia para contrarrestar la resistencia	40
4) CEFDITOREN.....	43
OBJETIVOS.....	46
MATERIAL Y MÉTODOS	48
1) CENTROS E INVESTIGADORES	49
2) ESTUDIOS DEL PROGRAMA	52
2.1 Estudios de susceptibilidad realizados con cefditoren.....	52
2.2 Estudios de farmacodinamia realizados con cefditoren	56
2.3 Estudios sobre ecología bacteriana realizados con cefditoren	58
RESULTADOS.....	59

DISCUSIÓN	65
1) FARMACOEPIDEMIOLOGÍA DE LA RESISTENCIA.....	66
1.1 Actividad in vitro de cefditoren en la dinámica cambiante de <i>S. pneumoniae</i>	66
1.2 Actividad in vitro de Cefditoren frente a <i>H. influenzae</i>	69
1.3 Actividad in vitro de Cefditoren frente a <i>S. pyogenes</i>	70
2) FARMACODINAMIA	72
2.1 Como herramienta predictora de eficacia: Simulaciones farmacodinámicas.....	72
2.2 Como herramienta para contrarrestar la resistencia.	76
2.2.1 Dentro de la misma cepa	77
2.2.2 Nichos multibacterianos de la misma especie.....	79
2.2.3 Nichos multibacterianos de distintas especies.	82
CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	88

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABC	Área Bajo Curva de las concentraciones plasmáticas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ARISE	Antimicrobial Resistance In Southern Europe
BLNAR	Betalactamasa negativa ampicilina resistente
BLPACR	Betalactamasa positiva amoxicilina/clavulánico resistente
BSAC	British Society for Antimicrobial Chemotherapy
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
Cmax	Concentración plasmática máxima
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida
FDA	Food and Drug Administration
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PBPs	Penicillin Binding Proteins (Proteínas fijadoras de penicilina)
PCV-7	7- valent Pneumococcal Conjugate Vaccine (Vacuna neumocócica conjugada heptavalente)
PD	Farmacodinamia
PK	Farmacocinética
PMN	Polimorfonuclear
SAUCE	Susceptibilidad a los Antibióticos Usados en la Comunidad en España
ufc	Unidades formadoras de colonias

INTRODUCCIÓN

Lo que hace tan interesante el mundo de los antibióticos es que está sujeto a cambios continuos. No se debe olvidar que la diana de los antibióticos son seres vivos, que en ciertos casos como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *S. pyogenes* tienen al ser humano como ecosistema exclusivo. Estos tres microorganismos colonizan la nasofaringe y comparten nicho con otras especies. Como seres vivos, y especialmente por su capacidad de adaptarse, están sujetos a evolución natural, la cual, en el último siglo, ha estado fuertemente condicionada por las diferentes estrategias terapéuticas y profilácticas desarrolladas por el hombre. La selección bacteriana producida por el uso de los antibióticos altera el contexto ecológico porque modifica la ecología de la población bacteriana, lo que condiciona la evolución de todo el sistema microbiano (1, 2).

En esta biosfera cambiante, es necesario mantener actualizados los datos sobre antibióticos mediante la realización de estudios de actividad in vitro en distintos entornos geográficos, modelos de farmacocinética y farmacodinamia como predictores de eficacia y modelos animales que demuestren eficacia bacteriológica in vivo antes de iniciar la fase de desarrollo clínico en humanos

Para obtener la autorización de un antibiótico es necesario demostrar que es eficaz, seguro y bien tolerado en el tratamiento de las infecciones bacterianas. Un antibiótico se considera bien tolerado cuando su acción es específica sobre la célula procariota, de modo que cualquier efecto sobre la célula eucariota puede ser considerado como un efecto adverso. Considerando que el 90% de las 10^{14} células del cuerpo humano son procariotas (1), constituyendo la microbiota humana o flora comensal, la necesidad de erradicar patógenos bacterianos (objetivo de la terapia antibiótica y principal determinante del resultado terapéutico) debe evaluarse teniendo en cuenta los efectos que los antibióticos tendrán en las células eucariotas,

en la microbiota humana así como en la selección, evolución y diseminación/difusión de resistencia.

En el desarrollo de un antibiótico el objetivo es definir la dosis óptima y la duración del tratamiento que obtenga los mejores resultados clínicos, con la menor toxicidad para el paciente, el mínimo impacto en la microbiota humana y con el menor desarrollo de resistencias. Sin embargo, las Autoridades Reguladoras no consideran todas estas variables cuando evalúan un nuevo antibiótico para su autorización y posterior comercialización, centrándose los requerimientos del regulador casi exclusivamente en los resultados clínicos y en la toxicidad del nuevo antibiótico. Mientras que los efectos adversos pueden detectarse en etapas tempranas del desarrollo clínico, la aparición y posterior difusión de resistencia suele ocurrir más tarde y no ser tan obvia su manifestación.

Debido al impacto que el uso de los antibióticos tendrá en la microbiota humana y en el desarrollo de resistencias este debería estudiarse en la fase pre-comercialización de cualquier antibiótico.

1) DESARROLLO DE UN ANTIBIÓTICO

Las fases de desarrollo de un fármaco están claramente establecidas por las Agencias Reguladoras, siendo su implementación requisito imprescindible para la elaboración del dossier de registro de un nuevo fármaco. Posteriormente a su evaluación, las Agencias Reguladoras procederán a su autorización siempre que se demuestre la seguridad, eficacia y calidad del nuevo medicamento de acuerdo con las directivas europeas y/o "guidelines" internacionales así como con la regulación nacional al respecto.

El desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso multidisciplinar que requiere la colaboración de expertos en distintas áreas de investigación. El trabajo en equipo de especialistas en química, biología, farmacia y medicina hará posible el desarrollo de nuevos medicamentos que cumplan con los objetivos para los cuales fueron diseñados.

Antes de iniciar la fase de desarrollo clínico (Fase I – Fase III), las Agencias Reguladoras exigen un desarrollo preclínico. Dentro de este desarrollo preclínico se encuentran estudios relativos a:

- Farmacología:
 - Farmacodinamia Primaria (selectividad, especificidad, potencia)
 - Farmacodinamia Secundaria y de seguridad (por órgano)
 - Interacciones medicamentosas farmacodinámicas
- Farmacocinética:
 - Métodos analíticos e informes de validación
 - Absorción, distribución, metabolismo y excreción

- Interacciones medicamentosas farmacocinéticas
- Otros estudios farmacocinéticos
- Toxicología:
 - Dosis única
 - Dosis repetida
 - Genotoxicidad: in vitro e in vivo
 - Carcinogenicidad:
 - Estudios a corto plazo
 - Estudios a medio y largo plazo (incluyendo estudios con rango de dosis)
 - Toxicidad reproductiva y sobre el desarrollo:
 - Fertilidad y desarrollo embrionario temprano
 - Desarrollo embrionario fetal
 - Desarrollo pre y post-natal, incluyendo función materna
 - Estudios de administración y/o posterior evaluación de la camada
 - Tolerancia local
 - Otros estudios de toxicidad:
 - Antigenicidad
 - Inmunotoxicidad
 - Estudios sobre mecánica (si no se han incluido anteriormente)
 - Dependencia
 - Metabolitos
 - Impurezas

El desarrollo preclínico de un antibiótico pasa por las mismas fases que cualquier otro fármaco con la fase adicional de estudiar su actividad microbiológica frente a los patógenos diana y de forma comparativa a los antibióticos existentes.

Esta etapa, postoxicológica y pre-terapéutica, es de crucial importancia pero temporalmente y de forma comparativa con otras fases la más corta, por lo que su diseño es crítico ya que sus resultados condicionarán el desarrollo de las fases clínicas posteriores.

Es obvio que los estudios tradicionales exigidos por las Agencias Reguladoras (determinación de sensibilidad por dilución o difusión en agar frente a los patógenos que se consideran diana) son imprescindibles, pero también deberían considerarse aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos en el diseño de estos estudios. Además, publicaciones recientes destacan que factores epidemiológicos, ecológicos y de la inmunología del huésped juegan un papel fundamental en la eficacia de un antibiótico así como en la interpretación y valoración de los resultados, por lo que también deben considerarse al diseñar el programa de desarrollo de un antibiótico.

Test de susceptibilidad y puntos de corte

Considerando que la mayoría de los tratamientos antibióticos se establecen de forma empírica y por tanto se desconoce el patógeno potencial implicado, para que la elección del antibiótico sea la óptima se deben mantener actualizados los datos de susceptibilidad antibiótica mediante estudios in vitro y epidemiológicos.

Desde un punto de vista microbiológico, los tests de susceptibilidad antibiótica valoran el grado de actividad de un antibiótico frente a un patógeno específico sin tener en cuenta las variables clínicas que afectarán al paciente.

Los tests de susceptibilidad antibiótica determinan la concentración mínima inhibitoria (CMI) o la concentración mínima bactericida (CMB) en condiciones

estáticas. La CMI es la mínima concentración ($\mu\text{g/ml}$) de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de una determinada cepa. Habitualmente se considera la CMI_{90} que es la concentración que inhibe el crecimiento del 90% de los aislamientos de una determinada especie. Cuanto mayor sea su valor, menor será la actividad intrínseca del antibiótico.

Por otro lado, la ausencia de inhibición del crecimiento bacteriano por las concentraciones sistémicas del antibiótico alcanzables tras dosis habituales se define como resistencia (NCCLS/CLSI).

Para interpretar los resultados de los tests de susceptibilidad antibiótica es necesario desarrollar una guía donde el término "breakpoint" o punto de corte defina sensibilidad o resistencia. Si el objetivo es detectar poblaciones "salvajes" bacterianas (aquellas que no tienen resistencia a los antibióticos estudiados) hablamos de puntos de corte microbiológicos, pero si nos referimos a la relación entre variables farmacocinéticas y los resultados de los tests de susceptibilidad (por ejemplo, perfil de concentraciones antibióticas a lo largo del tiempo en relación con la CMI) con objeto de predecir erradicación bacteriana y resultado clínico (3,4), entonces hablamos de puntos de corte farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD). Y por último, si nos referimos a la probabilidad de que el tratamiento sea exitoso o que fracase basado en los resultados clínicos y microbiológicos de los ensayos clínicos, los puntos de corte son clínicos.

Sin embargo, el valor de los datos proporcionados por los ensayos clínicos en relación a los puntos de corte es limitado debido a:

- la ausencia de un número suficiente de cepas resistentes, ya que no sería ético incluir pacientes infectados por cepas resistentes al antibiótico objeto de investigación
- la falta de un número suficiente de cepas con distintos fenotipos de no-sensibilidad (tolerancia, resistencia intermedia, resistencia completa....)
- insuficiente número de cepas de cada especie bacteriana que potencialmente puedan estar implicadas en la infección (con la consiguiente inadecuada extrapolación de puntos de corte a la mayoría de las especies más comunes)

y por último,

- el requisito regulatorio de no-inferioridad frente a antibióticos ya autorizados (5).

Además de lo anterior, y teniendo en cuenta que para un nuevo antibiótico los puntos de corte se establecen antes de que aparezca la resistencia, estos podrían no ser adecuados cuando las bacterias desarrollen una disminución en su sensibilidad (6) y por ello los puntos de corte se deben revisar en las siguientes circunstancias:

- si aparecen nuevos mecanismos de resistencia en bacterias responsables de la infección que previamente eran sensibles,
- si los puntos de corte disponibles no detectan de forma segura el nuevo mecanismo de resistencia,
- cuando hay casos de fracaso clínico causado por bacterias portadoras de resistencia que anteriormente eran sensibles al antibiótico,

- cuando se desarrollen nuevas dosis o formulaciones de antibióticos ya comercializados

y por último,

- si hay nuevas indicaciones de uso (lugares de acción previamente no incluidos en ficha técnica) (5,6).

Simulaciones farmacodinámicas

Durante la fase de investigación clínica la evaluación de la eficacia de un antibiótico se realiza en función de los resultados de curación clínica y los de erradicación bacteriana.

Sin embargo, como ya se ha mencionado previamente, en los ensayos clínicos que evalúan un nuevo antibiótico, encontraremos un escaso o nulo número de pacientes infectados con cepas portadoras de distintos fenotipos de resistencia, así como pocos datos que permitan predecir la selección de resistencia y su posterior difusión o transmisión. Esto unido al hecho de que generalmente los puntos de corte, predictores de eficacia, se estiman considerando datos obtenidos con cepas sensibles (que quizás no serían adecuados para cepas con cierta resistencia (7)), concede gran valor a los datos obtenidos mediante modelos de simulación in vitro computerizados, al reflejar mejor que los clásicos tests de susceptibilidad antibiótica la infección y las condiciones del tratamiento.

Los modelos in vitro computerizados simulan la farmacocinética del antibiótico y proporcionan información sobre la muerte bacteriana durante todo el intervalo de dosificación, pudiendo predecir éxito con respecto a la erradicación bacteriana así como la aparición y consiguiente selección de resistencia y/o la relación entre ambas:

a) Con respecto a la erradicación bacteriana, los modelos de simulación in vitro se utilizan para determinar la actividad antimicrobiana frente a fenotipos de resistencia prevalentes y no prevalentes, y de este modo establecer los intervalos de dosificación adecuados. La gran ventaja de estos modelos es que proporcionan información que permite ahorrar tiempo en el desarrollo del fármaco y evita ensayos clínicos innecesarios o con un diseño inapropiado (8). Estos modelos de simulación son también herramientas pre-clínicas eficaces para el desarrollo de nuevas indicaciones. Por ejemplo, en infección urinaria en la comunidad, para un antibiótico aprobado en otras indicaciones, la simulación de las concentraciones alcanzadas en orina frente a los potenciales patógenos bacterianos permite obtener datos que ayudaran a diseñar mejor el desarrollo clínico posterior.

b) Con respecto a la aparición/selección de resistencias, las simulaciones farmacodinámicas son instrumentos eficaces y prácticos para definir los valores PK/PD que previenen la aparición de subpoblaciones resistentes (5, 9) aspectos de gran trascendencia, desde el punto de vista ecológico, epidemiológico y clínico.

Otro campo que es posible abordar con los modelos farmacodinámicos es la predicción de la difusión de resistencias en nichos multibacterianos (simulando la nasofaringe) entre distintas cepas de la misma especie o en subpoblaciones resistentes dentro de una cepa o de cepas resistentes en un nicho con cepas de distintas especies. La información proporcionada por estos modelos será una

herramienta útil para predecir la selección de resistencia y su posterior difusión y, por tanto, ayudará a establecer mejor los mecanismos de prevención o control.

Entre otros estudios, estos modelos pueden utilizarse para explorar los efectos que las concentraciones de nuevas formulaciones tendrán frente a cepas no sensibles al antibiótico (10), para explicar los fracasos clínicos y determinar el valor PK/PD necesario para prevenir la aparición de subpoblaciones resistentes (11), para estudiar la influencia que el lugar de la infección tendrá en los valores PK/PD (12) y para investigar distintos regímenes de dosificación frente a fenotipos/genotipos de resistencia (13).

Correlación con datos clínicos

Los resultados farmacodinámicos (predicción de eficacia) procedentes de simulaciones in vitro y modelos animales, se correlacionan bien con algunos estudios clínicos (5). En el caso de *S. pyogenes* el $T > CMI$ (el tiempo que la concentración de antibiótico excede la CMI, expresado como porcentaje del intervalo de dosificación) es el parámetro que predice eficacia para β -lactámicos o macrólidos, habiéndose establecido como necesario el valor del 40% del intervalo de dosificación. En el caso de las quinolonas, el parámetro que mejor se correlaciona con eficacia es el cociente del área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas vs tiempo y la CMI (ABC/CMI), habiéndose establecido como necesario el valor de 30. Con relación a la selección de resistencias en *S. pneumoniae* la resistencia a β -lactámicos y macrólidos ocurre principalmente por la adquisición de genes por transferencia (la resistencia de novo es rara) (14) y el valor del $T > CMI$ que previene la aparición de resistencia es el 40% del intervalo de dosificación, mientras que para las quinolonas la resistencia se debe a mutaciones espontáneas (14) y para prevenirla se necesita

un valor de ABC/CMI de 200-300 (11), un valor muy superior al que predice eficacia, debido a la necesidad de cubrir las CMIs de posibles mutantes resistentes (11). Los valores que predicen eficacia no suelen variar entre cepas de la misma especie bacteriana (7), sin embargo, si varían en función de las especies, de las condiciones experimentales y de factores del hospedador (15, 16).

A pesar de que los modelos farmacodinámicos constituyen en la actualidad la mejor aproximación in vitro a la infección, es importante destacar que la presencia de proteínas séricas puede influir en la actividad del antibiótico frente a la bacteria. La albúmina puede limitar parte de la actividad antibiótica al ligar una fracción del antibiótico mientras que inmunoglobulinas y complemento pueden mostrar un efecto sinérgico con los antibióticos (17-19). Así, estudios in vitro (curvas de muerte) realizados para evaluar el efecto de la presencia de amoxicilina y ácido clavulánico sobre la fagocitosis de *S. pneumoniae* serotipo 9 resistente (17-19) mostraron que el ácido clavulánico (no activo per se frente a *S. pneumoniae*) redujo el 50% del inóculo inicial en presencia del complemento y PMNs y sin embargo esta reducción no se observó en ausencia de ácido clavulánico (18). Frente a la misma cepa, la actividad bactericida se consiguió a las 3h de la incubación con amoxicilina-clavulánico en presencia de PMNs y complemento y no fue bactericida cuando uno de los dos componentes no estuvo presente (17).

En relación con la albúmina, aunque está generalmente aceptado que solo la fracción libre (la no ligada de antibiótico) es la responsable de la actividad in vitro (y presumiblemente in vivo), la rapidez y reversibilidad de la unión plantea dudas sobre la rigidez de esta consideración. La unión a proteínas depende de una constante de disociación; si ésta es baja, la unión a proteínas puede tener un efecto pequeño en la actividad antibacteriana.

Estudios realizados con antibióticos con elevada unión a proteínas plasmáticas, utilizando curvas de muerte bacteriana con concentraciones totales en medios con albúmina sérica (a concentraciones fisiológicas), han mostrado una actividad antibacteriana superior a la proporcionada por concentraciones similares a la fracción libre de antibiótico en suero (20). Por ello, el estudio del efecto de la unión a proteínas séricas es importante y debe realizarse utilizando cepas con fenotipos de resistencia que impliquen CMI en el límite de sensibilidad.

2) FARMACOEPIDEMIOLOGÍA DE LA RESISTENCIA

Las superficies mucosas pueden ser colonizadas simultáneamente por múltiples especies. Las especies bacterianas objeto de estudio en esta tesis, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, tienen en común, entre otras cosas, ser parte de la microbiota nasofaríngea humana. Esto implica que la transmisión directa entre seres humanos, la cual ocurre vía “droplets” (gotitas respiratorias), es crítica para su persistencia. El éxito de un organismo en colonizar y posiblemente producir la subsiguiente infección podría estar determinado por su capacidad para competir con los co-habitantes de su nicho. Cuando se producen cambios en su nicho ecológico y cuando migran a otros nichos, se transforman en patógenos siendo responsables de las infecciones más prevalentes adquiridas en la comunidad: *S. pyogenes* como agente etiológico de la faringoamigdalitis y *S. pneumoniae* y *H. influenzae* como agentes etiológicos de las infecciones del tracto respiratorio inferior, otitis y sinusitis.

Por tanto, además de ser bacterias comensales pueden convertirse en agentes patógenos directos. Además, el *H. influenzae* no tipable, puede actuar como patógeno indirecto al producir β -lactamasas que protegen a los dos gram-positivos capsulados del género *Streptococcus* de la acción de la penicilina.

En la era de los antibióticos la capacidad de adaptación de estas bacterias ha tenido como consecuencia la aparición de sensibilidad reducida a antibióticos, con multiresistencia en *S. pneumoniae*, con resistencia a macrólidos con o sin producción de β -lactamasa y/o resistencia no enzimática a β -lactámicos en *H. influenzae* y con una disminución en la sensibilidad o resistencia a los macrólidos en el caso de *S. pyogenes*. Todos estos perfiles de no sensibilidad surgen como resultado de la presión antibiótica que ha favorecido la difusión clonal y policlonal de este tipo de resistencias.

Por un lado, la resistencia antibiótica hace necesario disponer de nuevos antibióticos y por otro, su consumo seleccionará nuevas resistencias, cerrando un círculo vicioso. Por tanto, para romper el círculo o frenar la aparición de resistencias, un nuevo antibiótico debe ser activo frente a los microorganismos resistentes y mínimamente selector de resistencia en la microbiota humana con el menor impacto ecológico posible.

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae posee una cápsula (actualmente se conocen 93 serotipos) que actúa como factor de virulencia permitiendo a la bacteria “escapar” de la opsonización mediada por el complemento. Además, las proteínas de superficie permiten que *S. pneumoniae* colonice y se adhiera a la nasofaringe humana, siendo esta su exclusivo hospedador. La permanencia del *S. pneumoniae* en la nasofaringe facilita la transmisión exógena y la colonización de la nasofaringe de nuevos huéspedes. Por otro lado la presencia de otras cepas y especies en la nasofaringe favorece el contacto entre cepas. La presión antibiótica continua y la capacidad del neumococo de incorporar ADN, mediante transformación, de otros neumococos (ó especies próximas como *Streptococcus* orales) son los principales responsables de la adquisición y evolución de los fenotipos de resistencia en *S. pneumoniae* (21).

S. pneumoniae es un patógeno bacteriano que responde con rápidos cambios a las intervenciones clínicas. Los serotipos pueden actuar como cuasi especies y las medidas terapéuticas, consumo de antibióticos, y medidas preventivas, como la introducción de la vacuna heptavalente, influyen sobre la evolución de los neumococos, siendo la no-sensibilidad antibiótica serotipo-dependiente (22). En este

sentido, se ha notificado distinta incidencia de los distintos serotipos en función de parámetros geográficos y de edad, lo que ha llevado a proponer, desde la perspectiva epidemiológica, a cada serotipo como un patógeno distinto (23).

2000-2010: Impacto de medidas terapéuticas y preventivas en la evolución de *S. pneumoniae*

La decreciente sensibilidad a la penicilina en *S. pneumoniae* ha sido un problema grave durante décadas. Según un estudio realizado a nivel mundial, con aislados clínicos de neumococos recogidos durante 1999-2000, la no-sensibilidad a penicilina ($\text{CMI} \geq 0.12 \mu\text{g/ml}$) fue del 24,7% en Europa Occidental, del 40,7% en Europa del Este, del 31,9% en Norteamérica, del 42,1% en Latinoamérica, del 21,5% en Australia y del 68% en Asia (24). La resistencia múltiple (definida como resistencia completa a dos o más antibióticos de las seis clases representadas por penicilina, eritromicina, cefuroxima, tetraciclina, trimetoprin/sulfametoxazol y levofloxacino) en *S. pneumoniae*, en los primeros años del presente siglo y hasta 2004, era de un 19,1% en Norteamérica, 27,7% en Europa Occidental y 80,4% en Extremo Oriente (25).

A partir del año 2000 la introducción de la vacuna heptavalente de *S. pneumoniae* (PCV-7), para la inmunización infantil, ha influido en la evolución de las poblaciones neumocócicas alterando la distribución de los serotipos y/o los patrones de no-sensibilidad a antibióticos, con un efecto rebaño ("herd effect") en la población adulta (26). Además de conseguir una reducción notable en la incidencia de enfermedad neumocócica invasiva (27), se ha producido una marcada disminución en la prevalencia de los serotipos incluidos en la vacuna y en el porcentaje de aislados clínicos invasivos no sensibles a la penicilina y/o eritromicina en la población infantil y adulta (22, 28). Este efecto se observa claramente al analizar los datos de

España, donde la PCV-7 fue introducida en el mercado privado en Junio del año 2001, con un incremento de vacunaciones desde el año 2002 en adelante alcanzando una cobertura no superior al 50% en 2006 (29). En el año 2001, del total de aislados invasivos (niños y adultos) recibidos en el Laboratorio de neumococos del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III), un 43% eran aislados de serotipos incluidos en la PCV-7, de los cuales el 61% eran aislados de niños y el 38% de adultos. En 2007 los serotipos incluidos en la PCV-7 representaban un 20% del total de los aislados invasivos, 15% en niños y 21% en adultos (28). Como los serotipos incluidos en la PCV-7 están asociados a no-sensibilidad a la penicilina/eritromicina, la disminución de la prevalencia de los serotipos incluidos en la PCV-7 ha venido acompañada por una disminución en la no-sensibilidad a penicilina/eritromicina.

En un estudio epidemiológico realizado durante los años 2001-2002 en España incluyendo principalmente aislados no invasivos, el porcentaje de cepas no sensibles a penicilina era del 43,9% (30). Usando la penicilina como marcador epidemiológico para la no-sensibilidad (considerando los puntos de corte del CLSI para la penicilina oral) este estudio demostró que los porcentajes de no-sensibilidad a β -lactámicos y macrólidos estaban alrededor del 0% y del 15% respectivamente entre las cepas sensibles a la penicilina; para cepas con sensibilidad intermedia a la penicilina, los porcentajes de no-sensibilidad fueron alrededor del 80% para cefaclor, del 50% para la cefuroxima y del 60% para macrólidos; para las cepas resistentes a la penicilina, los porcentajes de no-sensibilidad fueron del 35% para amoxicilina/clavulánico, del 100% para cefaclor y cefuroxima y del 60% para macrólidos (30). Según estos resultados, la no-sensibilidad a β -lactámicos y macrólidos aparecía claramente agrupada o recluida en las cepas de *S. pneumoniae* con sensibilidad intermedia y/o resistente a la penicilina. Cinco años después datos de un nuevo estudio epidemiológico en aislados clínicos no invasivos mostraron que el porcentaje de no-

sensibilidad a penicilina había disminuido significativamente, pasando del 43,9% al 22,9% con una menor variación en el porcentaje de no-sensibilidad a la eritromicina que pasó del 34,5% al 22,9% (31). La disminución en la no-sensibilidad a la penicilina y eritromicina vino acompañada de disminución en la no-sensibilidad a otros β -lactámicos y macrólidos, con porcentajes globales que pasaron del 38,4% al 21,0% para cefaclor, del 32,6% al 5,6% para cefuroxima, del 7,8% al 5,2% para amoxicilina/clavulánico, del 3,3% al 0,4% para cefotaxima y 35,2% al 22,4% para azitromicina (30, 31). Lo mismo ocurrió al analizar los aislados invasivos donde la disminución en serotipos incluidos en la vacuna PCV-7 desde el año 2001 hasta el año 2007 se correlacionó con la disminución en la no-sensibilidad a la penicilina, que pasó de un 34% a un 22%, y a la eritromicina, que pasó del 28% al 20% (28).

Sin embargo, la disminución en la incidencia de los serotipos incluidos en la PCV-7, asociada con una disminución en la no-sensibilidad a penicilina/eritromicina, dejaba libre un nicho ecológico que podía ser ocupado por serotipos no incluidos en la PCV-7, los cuales tenían más probabilidad de estar expuestos a la presión antibiótica y a especies próximas capaces de transferirles genes que codifican la resistencia antibiótica (32).

En España la disminución de los serotipos incluidos en la PCV-7 se ha visto ligada al aumento de los serotipos no incluidos en la vacuna, principalmente serotipos 1, 19A, 5, 7F y 3 (22). En este sentido, en un estudio epidemiológico prospectivo de la enfermedad neumocócica invasiva realizado durante los años 2007-2009 en Madrid, después de la inclusión en octubre de 2006 de la PCV-7 en el calendario oficial de vacunación infantil, los serotipos más frecuentes fueron: 1, 19A (con un patrón policlonal), 5, 7F y 3. El serotipo 19A mostró no-sensibilidad a penicilina parenteral, cefotaxima y eritromicina (33). Este serotipo se ha convertido en el más problemático, ya que desde entonces se ha descrito una tendencia creciente en su prevalencia

entre los neumococos invasivos junto con una creciente prevalencia de secuenciotipos no sensibles a la penicilina en este serotipo (22).

Es especialmente preocupante la rápida difusión intra serotipo 19A de nuevos secuencio-tipos no sensibles a la penicilina, tales como ST276 (detectado en el año 2000), ST878 (en 2003), ST4461 (en 2004), ST2013 (en 2006) y ST320 (en 2007). El aumento del serotipo 19A resistente a penicilina entre los aislados invasivos en España se ha asociado con la aparición y difusión clonal de dos clones multiresistentes diseminados a nivel mundial (ST276 y ST320) (34). Estos secuencio-tipos están presentes en el 83% de los aislados clínicos recogidos en un estudio epidemiológico hospitalario y prospectivo, realizado en Madrid, de enfermedad neumococica invasiva producida por el serotipo 19A. Todos los aislados clínicos de estos dos secuencio-tipos fueron no sensibles a penicilina oral y eritromicina, y además, los aislados del secuencio-tipo ST320 mostraron porcentajes de no-sensibilidad a la penicilina parenteral del 93,8% y a la cefotaxima del 75,0% (35).

La resistencia detectada entre los neumococos es consecuencia de su capacidad para adquirir por transformación genes que codifican las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) y de la presión selectiva ejercida por el uso de los antibióticos (36).

Teniendo en cuenta el aumento de los porcentajes de no-sensibilidad a penicilina, entre los serotipos no vacunales, debido a la redistribución de los serotipos después de la introducción de la PCV-7, y el aumento de la cobertura vacunal así como a la naturaleza recombinogénica del neumococo, parece necesario realizar estudios in vitro y estudios epidemiológicos que proporcionen información sobre la evolución de los serotipos y secuencio-tipos con el fin de utilizar las medidas profilácticas y terapéuticas disponibles de la mejor forma posible.

2.2 *Haemophilus influenzae*

H. influenzae es una bacteria común en la microbiota nasofaríngea humana, siendo su exclusivo hospedador. Los porcentajes de colonización por *H. influenzae* tipo b disminuyeron notablemente a raíz de la introducción, a principios de los años 90, de la vacuna conjugada de polisacáridos para prevenir la enfermedad invasiva en población infantil (37). Por el contrario, *H. influenzae* no tipable actualmente es un comensal frecuente del tracto respiratorio en población infantil y adulta que raramente se asocia con la enfermedad invasiva (38, 39). La exposición al *H. influenzae* no tipable comienza después del parto y desde entonces la colonización por diversas cepas, en periodos que van de días a meses, es un proceso dinámico donde las cepas colonizan y son eliminadas de la nasofaringe con un elevado nivel de rotación, alcanzándose índices de portadores sanos de hasta el 80% (40).

La co-colonización por múltiples cepas de *H. influenzae* y *S. pneumoniae* es frecuente en humanos (41) y se ha descrito que *H. influenzae* coloniza en mayor número (mayor carga bacteriana) cuando *S. pneumoniae* está presente (42). Con la introducción de la PCV-7 para la inmunización infantil, algunos autores han encontrado una mayor incidencia de *H. influenzae* no tipable, en niños vacunados debido al fenómeno de reemplazo (43).

Los niños que acuden a guarderías muestran porcentajes de colonización mayores que aquellos que no acuden a este tipo de centros, y esta colonización durante el primer año de vida está asociada con un mayor riesgo de desarrollar otitis media aguda y otitis media recurrente (44). *H. influenzae* no tipable también causa enfermedades como sinusitis y bronquitis (45). En adultos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica se encuentran múltiples cepas de *H. influenzae* no tipable, colonizando el tracto respiratorio inferior (46), siendo este el principal responsable de

las exacerbaciones agudas en la bronquitis crónica (47) y la adquisición de nuevas cepas de *H. influenzae* está asociada con un incremento del riesgo de nuevas exacerbaciones (48).

Las aminopenicilinas han sido ampliamente utilizadas en el tratamiento de las infecciones producidas por *H. influenzae* pero, como ocurrió en *S. pneumoniae*, a comienzos de los años 70 apareció la resistencia a ampicilina y se difundió en áreas donde el uso de antibióticos estaba generalizado y con poco control como España (49).

Los mecanismos de resistencia de *H. influenzae* son enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los enzimáticos, han sido documentadas dos clases de β -lactamasas plasmídicas: TEM1 y TEM2 que, transpuestas desde las enterobacterias, confieren resistencia a la ampicilina y otras aminopenicilinas; y ROB1 con menor frecuencia y más próxima a β -lactamasas de bacterias grampositivas que adicionalmente confiere a *H. influenzae* resistencia a cefaclor (50, 51). Los mecanismos de resistencia no enzimáticos implican sustituciones en las PBPs codificadas por el gen *ftsI*, descrito por primera vez en los años 80 en cepas de *H. influenzae* capsulados tipo b y no capsulados (52); estos mecanismos confieren resistencia a amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam y cefuroxima (53). Se ha notificado la presencia concomitante de ambos mecanismos de resistencia, enzimáticos y no enzimáticos, en aislados clínicos (54).

Aunque se ha descrito que la aparición de resistencias no enzimáticas a la ampicilina implica contacto célula/célula (55), *H. influenzae* de forma natural es capaz de tomar ADN de su entorno y se ha descubierto que in vitro el mecanismo de transferencia del gen *ftsI* implica una transformación clásica (56).

Una vez que aparece la resistencia su diseminación se ve favorecida por la presión antibiótica. En este sentido, han surgido cepas de *H. influenzae* con mecanismos de resistencia no enzimáticos, por transmisión horizontal y vertical, que han evolucionado adaptándose rápidamente a la presión selectiva derivada del uso de penicilinas orales y cefalosporinas (57).

2000-2010: Impacto de medidas terapéuticas y preventivas en la evolución de *H. influenzae*

Mientras que la resistencia a las quinolonas en *H. influenzae* continúa siendo excepcionalmente rara, la inmensa mayoría de las cepas son intrínsecamente resistentes a macrólidos por la presencia de las bombas de eflujo (51).

La epidemiología de la resistencia a ampicilina varía en función del área geográfica y del tiempo. En un estudio internacional (15 países), realizado en los años 2003-2004, el rango de resistencia a la ampicilina iba desde un 8,7% en Sudáfrica hasta el 29,6% en Asia (58). En los EE.UU. la resistencia a la ampicilina fue aproximadamente del 30% en el periodo 2001-2005 (59). En un estudio europeo (11 países) realizado en 2004-2005, la resistencia media a la ampicilina fue del 16,4%, con resistencias debidas a la producción de β -lactamasas que variaban entre un 17,6% en Francia y un 0% en Alemania y Holanda (60). En otro estudio epidemiológico realizado con posterioridad entre los años 2004 y 2008 se encontraron porcentajes parecidos de cepas productoras de β -lactamasas (61).

Es difícil conocer a nivel mundial la prevalencia de cepas que muestran mutación en el gen *ftsI* codificando la PBP3 (cepas BLNAR: β -lactamasa negativa ampicilina resistente; cepas BLPACR: β -lactamasa positiva amoxicilina clavulánico resistente) no solo por las diferencias encontradas en las distintas áreas geográficas y por el tiempo

de muestreo, si no también por el criterio que define BLNAR. Cuando se considera el criterio genético (presencia de la mutación en el gen *ftsI*) la prevalencia de BLNAR aumenta con respecto a la prevalencia determinada utilizando el criterio fenotípico (cepas no sensibles de acuerdo con el breakpoint ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ definido por el CLSI) ya que las sustituciones aparecen incluso en cepas con CMI's bajas como 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (51). En este sentido, aunque en algunos informes las cepas BLNAR son poco frecuentes, cuando se aplicaba el criterio genotípico las cepas que muestran mutaciones en el gen *ftsI* son más frecuentes de lo que previamente se pensaba (62).

Los distintos estudios epidemiológicos realizados ponen en evidencia el incremento de cepas BLNAR y BLPACR, aunque la prevalencia de estos fenotipos difiere de unos a otros. Así en el estudio de Darabi et al, realizado a nivel mundial entre 2004 y 2008, la prevalencia de cepas BLNAR y BLPACR fue de 1% y 0.2% respectivamente (61). En otro estudio realizado por Jansen et al entre los años 2004 y 2005 en 11 países europeos la prevalencia del fenotipo BLNAR iba desde el 33,9% en España hasta el 0% en Francia y Holanda (60). Sin embargo en un estudio epidemiológico realizado por Dabernat et al en Francia, utilizando el criterio genotípico el 18,9% de las cepas tenían mutaciones en el gen *ftsI* asociada o no con producción de β -lactamasas (63). En otro estudio, realizado por Jansen et al en Europa y Canadá durante 2006 – 2008, los porcentajes de prevalencia del fenotipo BLNAR fueron del 11,4% (64).

El país con la mayor prevalencia de cepas con mutaciones en el gen *ftsI* es Japón. Un estudio longitudinal realizado durante 25 años en Japón puso en evidencia un incremento en las cepas BLNAR, que pasaron del 15,4% en el año 1981 a más del 30% en el año 2005 (65). Este 30% fue también comunicado posteriormente en otro estudio llevado a cabo entre 2005 - 2008 en muestras procedentes de pacientes pediátricos (66). En otro estudio realizado con criterio genotípico durante el mismo

periodo de tiempo en aislados óticos, se encontró una prevalencia de BLNAR del 42,9% (67), con diseminación policlonal (como muestran otros estudios realizados en Japón y otros países (51)). Desde 1999 hasta 2008 también se observó un incremento en la prevalencia BLPACR con diseminación clonal (68).

En España, en la última década, según los estudios SAUCE (Susceptibilidad a los Antibióticos Usados en la Comunidad en España) (2001-2002, 2006-2007) la resistencia a ampicilina que venía disminuyendo desde el año 1996-1997 (38,6%) continuó haciéndolo, alcanzando porcentajes del 25,1% en 2001-2002, y del 16,1% en 2006-2007 (31). Esto fue debido tanto a una disminución de las cepas productoras de β -lactamasas, que pasaron del 20,0% en 2001-2002 al 15% en 2006-2007, como a la disminución de cepas con fenotipo BLNAR que pasaron del 4,4% al 0,7% en los mismos periodos (31).

A la vista de estos datos, parece necesario realizar estudios epidemiológicos que nos permitan determinar la prevalencia local de los distintos mecanismos de resistencia a β -lactámicos, a ser posible mediante el estudio de mutaciones que afectan a la CMI, y establecer la relevancia clínica de la resistencia mediante la recogida de datos clínicos. La actividad de los β -lactámicos actualmente utilizados como amoxicilina/clavulánico y cefuroxima axetilo puede estar comprometida debido al incremento detectado de cepas BLNAR y BLPACR.

2.3 *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes es un estreptococo del grupo A que, a diferencia de otros estreptococos, carece de un reservorio en la naturaleza de conocida importancia. Los seres humanos son su reservorio natural y ningún otro contribuye a su ciclo de vida (69, 70). El epitelio de la nasofaringe y la epidermis de la piel constituyen los nichos ecológicos primarios del *S. pyogenes*, de forma que la transmisión directa de persona a persona, que sucede vía gotitas respiratorias o por el contacto con la piel, es crítica para su supervivencia. *S. pyogenes* puede permanecer en un portador asintomático durante semanas o meses, con porcentajes de portadores en nasofaringe que van del 15 al 20% entre niños en edad escolar durante los periodos de mayor prevalencia (picos estacionales) (71, 72). A nivel mundial es responsable, como mínimo, de 616 millones de casos anuales de faringoamigdalitis y de 111 millones de infecciones de piel (73).

La cápsula de ácido hialurónico se correlaciona con la expresión de la proteína de superficie M, siendo ambos esenciales para producir infección (74). El antígeno T es la base principal del tipado serológico, como suplemento al M. En base al polimorfismo del gen *emm* se han diferenciado más de 100 tipos distintos (75, 76).

2000-2010: Impacto de medidas terapéuticas y preventivas en la evolución de *S. pyogenes*.

Aunque parece claro que la prevalencia de la resistencia antibiótica depende en parte del uso de antibióticos en la comunidad (77), el uso de los β -lactámicos no ha supuesto la aparición de resistencia a la penicilina en *S. pyogenes*, debido probablemente a la ausencia de variantes seleccionables portadoras de mecanismos de resistencia a β -lactámicos (78). Sin embargo, ha sido bien establecida la relación

entre el consumo de macrólidos y la difusión monoclonal de resistencia a los macrólidos en *S. pyogenes* (79, 80) como ocurre en España, donde solo unos pocos tipos de gen *emm* son responsables de la mayoría de las resistencias a macrólidos (81, 82).

Los dos mecanismos de resistencia a macrólidos corresponden al fenotipo M codificado por el gen *mef(A)* y al fenotipo MLS_B codificado por el gen *erm(A)* y *erm(B)*. La resistencia a los macrólidos se ha convertido en un problema mundial, los grados de resistencia a eritromicina en *S. pyogenes* varían entre países, desde un 6,9% en EE.UU. (56% fenotipo MLS_B) (83) hasta 25,6% en Hong Kong (84). En España, según los estudios SAUCE realizados durante los últimos años, aunque los porcentajes de resistencia a la eritromicina han venido disminuyendo, desde el 24,3% en 2001-2002 hasta el 19,0% en 2006-2007, no se ha encontrado una tendencia temporal decreciente (31). Por el contrario, si se ha observado una tendencia creciente en los porcentajes del fenotipo MLS_B entre las cepas resistentes, pasando del 14,0% en 2001-2002 al 35,5% en 2006-2007 (31). A pesar de ello, el *mef(A)* sigue siendo el principal determinante de resistencia a macrólidos, como también ha sido descrito recientemente en Alemania (85).

Es relevante destacar que ambos mecanismos de resistencia, fenotipos M y MLS_B, confieren resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos, por lo que la resistencia a eritromicina implica también resistencia a azitromicina y a claritromicina (86), siendo la resistencia a macrólidos clínicamente relevante en el tratamiento de las faringitis causadas por el estreptococo del grupo A (87).

En cuanto a la resistencia a quinolonas, desde que en el año 2001 se notificó el primer aislado de *S. pyogenes* resistente a fluoroquinolonas (88) se han venido detectando estos aislados resistentes en América, Europa y Japón (89-92) con

distribución clonal y policlonal (93). En España desde 1998, año de introducción del ciprofloxacino en la práctica terapéutica, varios clones con gen *emm* tipo 6 han desarrollado mutaciones en las topoisomerasas claves, reduciendo la sensibilidad a ciprofloxacino (94, 95). Aunque las fluoroquinolonas no se usan en población infantil, podemos atribuir a esta población la responsabilidad de diseminar las cepas de *S. pyogenes* no-sensibles en la comunidad (94, 95). En este sentido, hay un informe que muestra un incremento en la prevalencia de cepas con nivel de resistencia bajo a las fluoroquinolonas (definida como CMI entre 2-8 µg/ml al ciprofloxacino) que pasó del 1,9% en 2005 al 30,8% en 2007, en niños que no habían sido tratados con fluoroquinolonas (96).

Aunque se ha sugerido que la disminución en la resistencia a la eritromicina se debe a la disminución en el uso de los macrólidos, también se ha formulado la hipótesis de que dicha disminución podría ser el resultado del aumento de la presión ejercida por las fluoroquinolonas, ya que las cepas con mutaciones que desarrollan alta resistencia a las fluoroquinolonas pierden su rasgo de resistencia a la eritromicina (97).

Los cambios en la presión antibiótica durante los años 2000 han modificado los patrones de no-sensibilidad a macrólidos en *S. pyogenes*, con cambios en los fenotipos no-sensibles y con la aparición y diseminación de niveles bajos de resistencia a las fluoroquinolonas.

La vigilancia epidemiológica nos permitirá detectar la resistencia y de este modo diseñar mejor las estrategias terapéuticas en la comunidad donde *S. pyogenes* pueda estar implicado.

3) FARMACODINAMIA

La selección de un antibiótico, dosis y duración del tratamiento tendrá efectos a largo plazo sobre la aparición o selección de resistencias, y por este motivo deben considerarse sus efectos potenciales en cada decisión de tratamiento antibiótico (98). En este sentido, la administración antimicrobiana óptima se ha definido como aquella que su dosis y posología obtiene el mejor resultado clínico en el tratamiento de la infección con la mínima toxicidad para el paciente y el menor impacto en el desarrollo de resistencias (98-100).

Debido a que el uso de antibióticos se realiza principalmente en el ámbito ambulatorio y no en hospitales, las intervenciones encaminadas a mejorar su administración deberían ir dirigidas al ámbito extra-hospitalario (100). El principal objetivo en el desarrollo de un antibiótico para el tratamiento de infecciones adquiridas en la comunidad es definir el régimen adecuado y la duración óptima para conseguir el mejor resultado clínico con la mínima toxicidad para el paciente, el mínimo impacto en la microbiota humana y la menor capacidad de seleccionar resistencia (101).

La farmacodinamia (PK/PD) es un instrumento imprescindible para mejorar el manejo/administración de un antibiótico ya que el análisis PK/PD fundamenta la selección óptima, la dosis y duración del tratamiento (100). La farmacodinamia permite medir la exposición al fármaco que está íntimamente relacionado no solo con la capacidad de eliminar microorganismos, si no también con la capacidad de eliminar subpoblaciones resistentes emergentes (102).

3.1 La farmacodinamia como predictor de eficacia

Durante los últimos 15 años se ha profundizado en el conocimiento de las relaciones entre los parámetros PK/PD y los resultados clínicos, permitiendo establecer una correlación mejor entre los resultados in vitro y la eficacia in vivo (103). Actualmente los estudios PK/PD son críticos en el desarrollo de los fármacos para determinación de dosis e intervalos de dosificación a utilizar en ensayos clínicos y también para establecer los puntos de corte de sensibilidad (100).

Una vez conocido el parámetro PK/PD para un régimen posológico determinado pueden establecerse los puntos de corte PK/PD de sensibilidad, a partir de los cuales puede predecirse la actividad in vivo (102). Es importante señalar que distintas exposiciones al antibiótico se traducirán en diferentes grados de efecto antibiótico. Esto significa que para los β -lactámicos, al ser tiempo-dependientes, maximizar el tiempo durante el cual la bacteria está expuesta a concentraciones efectivas incrementa la probabilidad de una respuesta clínica y bacteriológica. En cualquier caso, no es necesario cubrir todo el intervalo de dosificación con concentraciones de fármaco superiores a la CMI para conseguir actividad bacteriostática o bactericida, los porcentajes clásicamente aceptados del intervalo de dosificación para patógenos respiratorios son 20 y 40% para carbapenámicos, 30 y 50% para penicilinas y 40 y 65% para cefalosporinas (102). También se han asociado con eficacia bacteriológica, para macrólidos en patógenos respiratorios, valores de 40-50% del intervalo de dosificación, donde la concentración sérica excede la CMI ($T > CMI$) (104). En fármacos concentración dependiente, como las fluoroquinolonas y los azálidos, maximizar la concentración incrementa la probabilidad de una respuesta positiva clínica y bacteriológica a la terapia, siendo la relación área bajo curva concentración vs tiempo / CMI (ABC/CMI) el parámetro PK/PD, con valores de 20-25, predictor de actividad bacteriostática y bactericida para patógenos respiratorios (102). Sin

embargo, para obtener resultados clínicos satisfactorios en el tratamiento de la neumonía neumocócica adquirida en la comunidad se necesitan valores de ABC/CMI ligeramente superiores, aproximadamente de 30 (102).

Aunque en la fase preclínica es importante establecer in vitro la asociación entre la exposición al fármaco y la respuesta, es crítico extrapolar esta asociación a pacientes reales. En los últimos años la introducción de modelos matemáticos como la simulación de Montecarlo, permite optimizar la combinación de datos PK/PD para predecir los resultados terapéuticos de posologías concretas en muestras poblacionales grandes (105). Para describir el rango probable de exposición que sucederá en la clínica se precisa previamente de información sobre la tendencia central y medidas de la dispersión del parámetro farmacocinético. La simulación según el procedimiento de Montecarlo ha demostrado que es un método válido para determinar la probabilidad de alcanzar un valor específico de cualquier índice farmacodinámico (ABC/CMI, $T > CMI$; CMI) para una población grande, siendo igualmente útil en varios campos de la medicina y otras ciencias aplicadas.

La predicción de eficacia en el caso de un antibiótico β -lactámico se calcula como un determinado valor de tiempo de concentración plasmática por encima de la CMI, la simulación de Montecarlo determina la probabilidad de alcanzar este índice ($T > CMI > 40\%$) en poblaciones grandes, esta probabilidad debe ser superior al 90%, ya que por debajo de este valor la probabilidad de que el régimen posológico sea eficaz se reduce de forma significativa (106). Este cálculo se hace para cada uno de los valores de CMI posibles en la población bacteriana previamente descrita.

Uno de los principales problemas para predecir la eficacia in vivo, es que los antibióticos in vivo interactúan con las bacterias de una forma más compleja que in vitro debido a la presencia de las proteínas séricas, que actúan como interfase. En

ausencia de métodos estandarizados para probar el impacto de la unión a proteínas en la actividad antibiótica (107), clásicamente se acepta que solo la fracción libre del antibiótico es activa in vitro y presumiblemente in vivo, y la extrapolación matemática de la fracción activa del total mediante el porcentaje de unión a proteínas es el método que se utiliza para estimar las concentraciones libres en cálculos farmacocinéticos. Sin embargo, la reversibilidad de la unión a proteínas implica que limitar la actividad a la fracción libre de forma absoluta puede no ser correcto incluso en fármacos con elevada unión a proteínas plasmáticas (108). Por esta razón, son esenciales estudios que permitan investigar el efecto de la unión a proteínas en la actividad antimicrobiana in vitro e in vivo, principalmente en fármacos con elevada unión a proteínas plasmáticas.

3.2 La farmacodinamia para contrarrestar la resistencia

En la última década, se han producido avances importantes en el conocimiento de los principios PK/PD, sin embargo la información disponible todavía presenta algunas lagunas, especialmente en relación con la prevención de la aparición de resistencia y su difusión. Estudios de regímenes de dosificación antibiótica dirigidos a la prevención del desarrollo de resistencia no han sido objeto de prioridad y la mayoría de los índices PK/PD se han centrado en la eficacia microbiológica y la consiguiente respuesta clínica (109).

La resistencia es un proceso que se desarrolla en dos etapas. La primera, la aparición, ocurre por mutaciones en el genoma (cromosomas, plásmidos o trasposones) o por adquisición de ADN exógeno mediante transformación o por conjugación. Esto sucede al azar y no depende de la presencia de antibióticos en el entorno (110). Sin embargo, parece que el estrés provocado por el antibiótico aumenta el intercambio

genético, incluyendo genes mediadores de resistencia (110), como se ha notificado con fluoroquinolonas que pueden inducir transformación del ADN de *S. pneumoniae* en ausencia de muerte bacteriana (111).

La segunda etapa es la diseminación de bacterias resistentes mediante clones (difusión clonal), plásmidos (difusión plásmidica) o determinantes de resistencia (difusión genética), y esto sí está claramente asociado con la presión selectiva ejercida por los antibióticos (110).

La resistencia, como resultado de mutaciones o por transformación del ADN, tiene un coste en la capacidad de adaptación ("fitness" bacteriano); así bacterias resistentes están frecuentemente peor adaptadas que las salvajes, siendo más competentes cuando el antibiótico está presente (109).

La presión antibiótica puede desenmascarar a pequeñas poblaciones resistentes y por este motivo son necesarios los estudios PK/PD con cultivos mixtos, que incluyan bacterias sensibles y bacterias portadoras de distintos determinantes de resistencia, para valorar la capacidad que tendrán distintos regímenes de dosificación de contrarrestar la difusión de resistencia.

De especial interés también son estudios que exploren los efectos que distintos regímenes antibióticos tendrán en la microbiota humana como por ejemplo, en la flora presente en la nasofaringe. La nasofaringe es el nicho desde el cual poblaciones resistentes de bacterias como *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *H. influenzae* (bacterias comensales exclusivamente adaptadas al hombre y las más prevalentes en las infecciones adquiridas en la comunidad) pueden seleccionarse y posteriormente diseminarse.

La farmacodinamia no solo es útil como herramienta para predecir la eficacia, también lo es para contrarrestar la difusión de resistencia y reducir los efectos

colaterales en la flora comensal, por lo tanto debería considerarse en cada decisión de tratamiento antibiótico junto con los criterios clásicos de seguridad, eficacia, vía de administración, cumplimiento y coste.

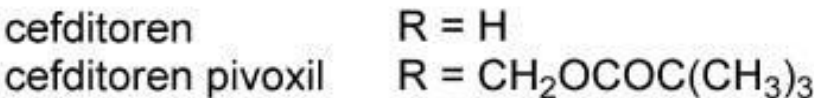
La búsqueda de criterios PK/PD y puntos de corte que puedan predecir la difusión de resistencia debería estudiarse mediante modelos PK/PD (109) incluyendo además de cepas salvajes como organismos diana, bacterias con distintos mecanismos de resistencia y niveles de sensibilidad.

4) CEFDITOREN

Cefditoren, descubierto por los doctores Kunio Atsumi, Kenji Sakagami, Ken Nishihata, Takashi Yoshida y Shunzo Fukatsu en Meiji Seika en Japón, es la forma activa de cefditoren pivoxil, una cefalosporina oral de tercera generación que posee en su estructura un grupo metiltiazol característico en posición C₃ y otros grupos estructurales similares a cefalosporinas de primera y tercera generación (112). En cefditoren el grupo localizado en la posición C₇ del esqueleto cefámico le confiere actividad frente a microorganismos gram-negativos mientras que el que se encuentra en la posición C₃, no visto en otras cefalosporinas de segunda o tercera generación, le confiere actividad frente a bacterias gram-positivas.

De acuerdo con el estudio de Yamada et al, la estructura de la PBP2x de *S. pneumoniae* forma un complejo con cefditoren de forma que el grupo metiltiazol situado en la posición C₃ de la cadena lateral de cefditoren encaja bien en el lugar de unión, "binding pocket", y esta característica probablemente le confiere su elevada actividad frente a cepas de *S. pneumoniae* (113). La presencia del grupo metoxiamino confiere a cefditoren su estabilidad frente a la hidrólisis de las β -lactamasas como TEM-1, TEM-2 y ROB-1 producidas por *H. influenzae*.

Cuando el profármaco cefditoren pivoxil se administra por vía oral, es rápidamente hidrolizado por las esterasas intestinales durante su absorción en el duodeno y se distribuye en sangre circulante como cefditoren activo. La biodisponibilidad oral de cefditoren pivoxil es baja en condiciones de ayuno (15-20%) pero aumenta de forma importante, cuando se administra con comidas de contenido graso, con incrementos del 50 y 70% en los valores medios de C_{max} y ABC respectivamente, comparados con los valores en ayunas (112).



atómico para el esqueleto cefámico.

En un estudio en Fase I realizado en el año 1993, en el que se administraron 400 mg de cefditoren pivoxil en dosis única después de la comida, los valores farmacocinéticos determinados fueron $C_{max} = 3,7 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$, $T_{max} = 2 \text{ h}$, $ABC_{\infty} = 12,5 \pm 1,6 \mu\text{g} \times \text{h/ml}$ y $t_{1/2} = 1,54 \pm 0,20 \text{ h}$ (114). El valor medio del volumen de distribución en estado de equilibrio fue de 9,3 L y el porcentaje medio de unión a proteínas, principalmente a la albúmina sérica, del 88% (112). Las concentraciones de cefditoren en mucosa bronquial han sido determinadas en pacientes a los que se les realizó fibrobroncoscopia después de haber recibido 400 mg de cefditoren pivoxil en dosis única 1 - 4h antes de la toma de muestra, con valores que fueron de 0,56 a 1,04 mg/Kg (112). Cefditoren no se metaboliza de forma apreciable y se elimina principalmente por orina, con un aclaramiento renal de aproximadamente 4,1-5,6 L/h.

Más de 10.000 pacientes han sido evaluados durante el desarrollo clínico de cefditoren pivoxil en EE.UU. y Europa de forma comparativa a los antibióticos recomendados en las distintas indicaciones estudiadas. Los resultados de los ensayos clínicos, en infección respiratoria adquirida en la comunidad, proporcionan datos de eficacia y seguridad en el tratamiento de faringoamigdalitis, sinusitis aguda, neumonía adquirida en la comunidad y en la exacerbación aguda de la bronquitis crónica.

La comercialización de esta nueva cefalosporina oral en Europa en 2004, con un perfil interesante desde el punto de vista microbiológico y farmacodinámico y su coincidencia con la implantación de programas de vacunación neumocócica (PCV-7), ofrecía la oportunidad de estudiar de forma continua la farmacodinamia de cefditoren en la ecología de la microbiota respiratoria humana.

España es un excelente lugar para explorar la actividad in vitro de este antibiótico frente a las bacterias responsables de las infecciones respiratorias en la comunidad debido, en primer lugar, a la prevalencia de cepas de *S. pneumoniae* no sensibles a antibióticos previos, *H. influenzae* no sensible a ampicilina (BLNAR, BLPACR) y *S. pyogenes* resistente a macrólidos y en segundo lugar a la red de investigación microbiológica existente.

OBJETIVOS

El objetivo general ha sido diseñar un programa de estudios preclínicos con cefditoren más allá de los exigidos por las Autoridades Reguladoras que permitan obtener datos que, interrelacionados entre si, muestren su actividad frente a bacterias con fenotipos de resistencia emergentes y determinen los parámetros farmacodinámicos que predican eficacia y previenen la selección de resistencias. Para ello pretendemos:

- 1) Obtener información actualizada sobre sensibilidad y resistencia a cefditoren y otros antibióticos en las bacterias más prevalentes en la infección respiratoria en la comunidad.
- 2) Conocer la actividad de cefditoren y los parámetros predictores de eficacia frente a cepas con determinados genotipos/fenotipos de resistencia, que no se van a encontrar en número suficiente en los ensayos clínicos terapéuticos, mediante la utilización de modelos farmacodinámicos.
- 3) Definir los valores de los parámetros PK/PD que predican la aparición de poblaciones y subpoblaciones resistentes.
- 4) Valorar de forma comparativa el impacto de cefditoren vs. otros antibióticos sobre la microbiota humana, mediante la simulación de "nichos ecológicos", a fin de predecir la potencial selección y transmisión de resistencias.

MATERIAL Y MÉTODOS

1) CENTROS E INVESTIGADORES

- Centro de investigaciones biológicas (CSIC) y CIBER de enfermedades respiratorias (CIBERES). Madrid. España.

Ramos-Sevillano E.

- Facultad de Medicina - Universidad Complutense. Departamento de Microbiología. Madrid. España

**Aguilar L,
Alou L,
Cafini F,
Echeverría O,
García E,
Giménez MJ,
González N,
López AM,
Prieto J,
Sevillano D,
Torrico M.**

- Facultad de Medicina - Universidad de Valencia, Departamento de Microbiología. Valencia. España

García de Lomas J.

- Facultad de Medicina – Universidad de Zaragoza. Departamento de Microbiología. Zaragoza. España.

**Becerril R,
Gómez-Lus R.**

- Fundación Jiménez Díaz. Departamento de Microbiología. Madrid. España

**Esteban J,
Fernández-Roblas R,
Gadea I,
García C,
Gracia M,
Granizo JJ,
López JC,
Ramos JM,
Santos F,**

**Díaz C,
García-Rodas R,
Cerrato V,
del Prado G,
Huelves L,
Ruiz V,
Naves PL,
Ponte MC,
Soriano F.**

- GlaxoSmithKline S.A. Departamento Médico. Madrid. España

Valdés L.

- Granadatos SL. Madrid. España.

Granizo JJ.

- Hospital de Donostia. Departamento de Microbiología. San Sebastián. España.

**Ercibengoa E,
Miramón JM,
Pérez-Trallero E.**

- Hospital Gregorio Marañón. Departamento de Microbiología, Madrid. España

Cercenado E.

- Hospital Clínico "Lozano Blesa". Departamento de Microbiología. Zaragoza. España.

**Castillo FJ,
Durán E,
Oca M,
Rubio-Calvo C,
Seral C.**

- Hospital Clínico San Joan de Deu. Departamento de Microbiología. Barcelona. España

Gené A.

- Hospital Clínico. Departamento de Microbiología. Barcelona. España

Marco F.

- Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Departamento de Microbiología. Santander. España

Martínez-Martínez L.

- Instituto de Salud Carlos III, Laboratorio Español Nacional de para *S. pneumoniae*. Madrid. España

**Casal J,
Fenoll A,
Robledo O,
Tarragó D,**

Vicioso M-D.

- Instituto Valenciano de Microbiología, Valencia. España.

**Cebrián L,
García de Lomas J,
Juan-Bañón JL,
Lerma M.**

- Tedec Meiji Farma, S.A., Departamento Científico. Madrid. España

**Coronel P,
Gimeno M,
Ródenas E.**

2) ESTUDIOS DEL PROGRAMA

2.1 Estudios de susceptibilidad realizados con cefditoren

Título del estudio	Centros e investigadores
<p>In vitro activity of cefditoren against clinical isolates of penicillin-susceptible and resistant strains of <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Haemophilus influenzae</i> and <i>Neisseria meningitidis</i></p> <p>J. Antimicrob Chemother 1996; 37:1037-1039</p>	<ul style="list-style-type: none"> Departamento de Microbiología, Fundación Jiménez Díaz. Madrid. España Fernández-Roblas R, López JC, Ramos JM, Soriano F. Departamento I+D, Tedec Meiji Farma, S.A. Coronel P, Gimeno M.
<p>Antimicrobial resistance among clinical isolates of <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolated in four Southern European Countries (ARISE Project) from adults patients: results from the Cefditoren Surveillance Program</p> <p>Journal of Chemotherapy 2003; 2: 107-112</p>	<ul style="list-style-type: none"> Departamento de Microbiología, Fundación Jiménez Díaz. Madrid. España Soriano F, Gracia M, Fernández-Roblas R, Esteban J, Gadea I, Santos F, Granizo JJ. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de la Salud Carlos III. Madrid. España. Fenoll A. Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P, Gimeno M, Ródenas E.
<p>Antimicrobial susceptibility of <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Haemophilus parainfluenzae</i> and <i>Moraxella catarrhalis</i> isolated from adults patients with respiratory tract infections in four Southern European countries. The ARISE project.</p> <p>Int. Journal of Antimicrobial Agents, 2004; 23: 296-299</p>	<ul style="list-style-type: none"> Departamento de Microbiología, Fundación Jiménez Díaz. Madrid. España Soriano F, Gracia M, García C, Fernández-Roblas R, Esteban J, Gadea I, Granizo JJ. Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P, Gimeno M, Ródenas E.
<p>Activity of cefditoren against clinical isolates of <i>Streptococcus pneumoniae</i> showing non-susceptibility to penicillins, cephalosporins, macrolides, ketolides or quinolones</p> <p>Int. Journal of Antimicrobial Agents, 2007; 29:223-232</p>	<ul style="list-style-type: none"> Laboratorio Nacional de Referencia de Neumococos en España. Instituto Carlos III. Madrid. España Fenoll A, Robledo O, Casal J. Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España. Aguilar L, Giménez MJ. Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P, Gimeno M.

Título del estudio	Centros e investigadores
<p>Influence of <i>Haemophilus influenzae</i> β-lactamase production and/or <i>ftsI</i> gene mutations on in vitro activity of and susceptibility rates to aminopenicillins and second and third generation cephalosporins. Int. Journal of Antimicrobial Agents, 2007; 30: 186-193</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Instituto Valenciano de Microbiología, Valencia. España. García de Lomas J, Lerma M, Cebrián L, Juan-Bañón JL. ▪ Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia, España García de Lomas J. ▪ Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P. ▪ Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España. Giménez MJ, Aguilar L.
<p>Influence of the β-lactam resistance phenotype on the cefuroxime versus cefditoren susceptibility of <i>Streptococcus pneumoniae</i> and <i>Haemophilus influenzae</i> recovered from children with acute otitis media. J. Antimicrob. Chemother, 2007; 60: 323-327</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Laboratorio Nacional de Referencia de Neumococos en España. Instituto Carlos III. Madrid. España Fenoll A, Robledo O, Tarragó D. ▪ Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España Giménez MJ, Aguilar L. ▪ Granadatos SL. Madrid. España. Granizo JJ. ▪ Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Gimeno M, Coronel P.
<p>Antimicrobial susceptibilities of amoxicillin-non-susceptible and susceptible isolates among penicillin-non-susceptible <i>Streptococcus pneumoniae</i>. Clinical Microbiology and Infection, Sept. 2007; Vol. 13, 9: 937-948</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Departamento de Microbiología. Hospital de Donostia, San Sebastián. España. Pérez-Trallero E, Miramón JM, Ercibengoa E. ▪ Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España. Giménez MJ, Aguilar L. ▪ Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P.

Título del estudio	Centros e investigadores
<p>In vitro activity of oral cephalosporins against pediatric isolates of <i>Streptococcus pneumoniae</i> non-susceptible to penicillin, amoxicillin or erythromycin Journal of Chemotherapy, 2008; vol 20, 2: 175-179</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Laboratorio Nacional de Referencia de Neumococos en España. Instituto Carlos III. Madrid. España Fenoll A, Robledo O, Tarragó D. ▪ Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España Giménez MJ, Aguilar L. ▪ Granadatos SL. Madrid. España. Granizo JJ. ▪ Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Gimeno M, Coronel P.
<p>Antimicrobial susceptibility of <i>Haemophilus influenzae</i> and <i>Moraxella catarrhalis</i> isolates in eight Central, East and Baltic European countries in 2005-2006: results of the Cefditoren Surveillance Study Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008; 61: 1180-1185</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Departamento de Microbiología y Quimioterapia Antimicrobiana. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. España. Gracia M, Díaz C. García-Rodas R, del Prado G, Huelves L, Ruiz V, Naves PL, Ponte MC, Soriano F. ▪ Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P, Gimeno M. ▪ Granadatos SL. Madrid. España. Granizo JJ.
<p>In vitro activity of cefditoren and other antimicrobial agents against 288 <i>Streptococcus pneumoniae</i> and 220 <i>Haemophilus influenzae</i> clinical strains isolated in Zaragoza, Spain Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2008 Oct.; 62 (2): 210-5</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Departamento de Microbiología; Hospital Clínico "Lozano Blesa". Zaragoza. España. Seral C, Rubio-Calvo C, Durán E, Oca M, Castillo FJ. ▪ Departamento de Microbiología; Facultad de Medicina. Zaragoza. España. Gómez-Lus R, Becerril R. ▪ Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Gimeno M, Coronel P.

Título del estudio	Centros e investigadores
<p>Genotypic versus Phenotypic characterization, with respect to β-lactam susceptibility, of <i>Haemophilus influenzae</i> isolates exhibiting decreased susceptibility to β-lactam resistance markers</p> <p>Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Jan 2009; 53 (1): 267-270</p>	<ul style="list-style-type: none"> Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España Sevillano D, Giménez MJ, Cafini F, Alou L, Aguilar L. Departamento de Microbiología, Hospital Gregorio Marañón. Madrid. España. Cercenado E. Departamento de Microbiología, Hospital Clínico San Joan de Deu. Barcelona. España. Gené A. Departamento de Microbiología, Hospital Clínico. Barcelona. España Marco F. Departamento de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. España. Martínez-Martínez L. Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P.
<p>Antimicrobial susceptibility of <i>Streptococcus pyogenes</i> in Central, Eastern, and Baltic European Countries, 2005 to 2006: the cefditoren surveillance program.</p> <p>Diagnostic Microbiology and Infectious disease, 2009; 64: 52-56</p>	<ul style="list-style-type: none"> Departamento de Microbiología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. España. Gracia M, Díaz C, García-Rodas R, Rodríguez-Cerrato V, del Prado G, Huelves L, Ruiz V, Naves PL, Ponte MC, Soriano F. Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P, Gimeno M. Granadatos SL. Madrid. España. Granizo JJ.
<p>Susceptibility of recently collected Spanish Pneumococci nonsusceptible to oral penicillin from serotypes not included in the 7-valent conjugate vaccine.</p> <p>Antimicrobial Agents and Chemotherapy, June 2010; vol 54, 6: 2696-2698</p>	<ul style="list-style-type: none"> Laboratorio Nacional de Referencia de Neumococos en España. Instituto Carlos III. Madrid. España Fenoll A, Vicioso M-D, Robledo O. Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España Aguilar L, Giménez MJ. Granadatos SL. Madrid. España. Granizo JJ. Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P.

2.2 Estudios de farmacodinamia realizados con cefditoren

Título del estudio	Centros e investigadores
<p>Are β-lactam breakpoints adequate to define non-susceptibility for all <i>Haemophilus influenzae</i> resistance phenotypes from a pharmacodynamic point of view?</p> <p>Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007 Apr; 59(4): 652-7</p>	<ul style="list-style-type: none"> Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España Alou L, Giménez MJ, Sevillano D, Aguilar L, González N, Echeverría O, Torrico M, Prieto J. Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P.
<p>Effect of human albumin and serum on the in vitro bactericidal activity of cefditoren against penicillin-resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i>.</p> <p>Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007; 60:156-158</p>	<ul style="list-style-type: none"> Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España Sevillano D, Giménez MJ, Alou L, Aguilar L, Cafini F, Torrico M, González N, Echeverría O, Prieto J. Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P.
<p>Influence of TEM-1 β-lactamase on the pharmacodynamic activity of simulated total versus free-drug serum concentrations of Cefditoren (400milligrams) versus amoxicillin-clavulanic acid (2,000/125 milligrams) against <i>Haemophilus influenzae</i> strains exhibiting and N526K mutation in the <i>ftsI</i> gene</p> <p>Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007 Oct; 51(10): 3699-3706.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España Torrico M, Aguilar L, González N, Giménez MJ, Echeverría O, Cafini F, Sevillano D, Alou L, Prieto J. Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P.

Título del estudio	Centros e investigadores
<p>High protein binding and cidal activity against penicillin-resistant <i>S. pneumoniae</i>: A Cefditoren in vitro pharmacodynamic simulation. Plos One, 2008 July; 3 (7): e-2717</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España Sevillano M, Aguilar L, Alou L, Giménez MJ, González N, Torrico M, Cafini F, Prieto J. ▪ Laboratorio Nacional de Referencia de Neumococos en España. Instituto Carlos III. Madrid. España Fenoll A. ▪ Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P.
<p>β-lactam activity against penicillin-resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i> strains exhibiting higher amoxicillin versus penicillin minimum inhibitory concentration values: an in vitro pharmacodynamic simulation Chemotherapy 2008; 54: 84-90</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Giménez MJ, González N, Echeverría O, Torrico M, Prieto J. ▪ Departamento Médico, GlaxoSmithKline S.A. Madrid. España Valdes L. ▪ Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P.
<p>Enhanced in vivo activity of cefditoren in pre-immunized mice against penicillin-resistant <i>S. pneumoniae</i> (serotypes 6B, 19F and 23F) in a sepsis model Plos One, 2010 August; 5 (8): e-12041</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España Cafini F, Jiménez MJ, Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Torrico M, González N, García E, Prieto J. ▪ Centro de investigaciones biológicas (CSIC) y CIBER de enfermedades respiratorias (CIBERES). Madrid. España. Ramos-Sevillano E. ▪ Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P.

2.3 Estudios sobre ecología bacteriana realizados con cefditoren

Título del estudio	Centros e investigadores
<p>Decrease in bacterial load versus resistance selection of pneumococcal subpopulations by β-lactam physiological concentrations over time: An in vitro pharmacodynamic simulation Microbial Drug Resistance, 2008; 14 (1): 241-249</p>	<ul style="list-style-type: none"> Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España Cafini F, Aguilar L, Sevillano D, Giménez MJ, Alou L, Echevarría O, Torrico M, González N, Prieto J. Centro Nacional de Microbiología. Instituto Carlos III. Madrid. España. Fenoll A. Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P.
<p>β-lactam effect on mixed cultures of common respiratory isolates as an approach to treatment effects on nasopharyngeal bacterial population dynamics. Plos One, December 2008; 3(12): e-3846</p>	<ul style="list-style-type: none"> Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Giménez MJ, González N, Torrico M, Cafini F, Prieto J. Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P.
<p>Influence of different resistance traits on the competitive growth of <i>Haemophilus influenzae</i> in antibiotic-free medium and selection of resistant populations by different β-lactams: an in vitro pharmacodynamic approach. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009; 63:1215-1222</p>	<ul style="list-style-type: none"> Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España González N, Aguilar L, Alou L, Giménez MJ, Sevillano D, Torrico M, Cafini F, Prieto J. Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P.
<p>Efficacy of simulated cefditoren versus amoxicillin-clavulanate free concentrations in countering intrastrain <i>ftsI</i> gene diffusion in <i>Haemophilus influenzae</i> Antimicrobial Agents and Chemotherapy, June 2011; 55(6): 2788-2794</p>	<ul style="list-style-type: none"> Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España González N, Aguilar L, Sevillano D, Giménez MJ, Alou L, Cafini F, Torrico M, López AM, Prieto J. Departamento Científico, Tedec Meiji Farma, S.A. Madrid, España. Coronel P.

RESULTADOS

Recopilación de artículos publicados

Desde el descubrimiento de cefditoren por los doctores Kunio Atsumi, Kenji Sakagami, Ken Nishihata, Takashi Yoshida y Shunzo Fukatsu en Meiji Seika en Japón y su posterior síntesis en 1988 se han realizado un gran número de estudios in vitro y ensayos clínicos en Japón, Europa y EE.UU.

Los artículos recogidos en este capítulo, publicados entre 1996 y 2011, muestran el amplio programa de estudios microbiológicos realizado con cefditoren, de forma comparativa con otros antibióticos utilizados en la comunidad, uno de los más extensos y continuados con datos generados en España en las bacterias más prevalentes en la infección respiratoria adquirida en la comunidad. La mayoría de estos estudios han sido diseñados y desarrollados con posterioridad a su comercialización en Europa en 2004.

Estudios de susceptibilidad realizados con cefditoren

[Fernández-Roblas R. et al. In vitro activity of cefditoren against clinical isolates of penicillin-susceptible and –resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*](#)
J. Antimicrob Chemother 1996; 37:1037-1039

[Soriano F. et al. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* isolated in four Southern European Countries \(ARISE Project\) from adults patients: results from the Cefditoren Surveillance Program](#)
Journal of Chemotherapy 2003; 2: 107-112

[Soriano F. et al. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated from adults patients with respiratory tract infections in four southern European countries. The ARISE project.](#)
Int. Journal of Antimicrobial Agents, 2004; 23: 296-299

[Fenoll A. et al. Activity of cefditoren against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* showing non-susceptibility to penicillins, cephalosporins, macrolides, ketolides or quinolones](#)
Int. Journal of Antimicrobial Agents, 2007; 29:223-232

[García de Lomas J. et al. Influence of *Haemophilus influenzae* \$\beta\$ -lactamase production and/or *ftsI* gene mutations on in vitro activity of and susceptibility rates to aminopenicillins and second and third generation cephalosporins.](#)
Int. Journal of Antimicrobial Agents, 2007; 30: 186-193

[Fenoll A. et al. Influence of the \$\beta\$ -lactam resistance phenotype on the cefuroxime versus cefditoren susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* recovered from children with acute otitis media.](#)
J. Antimicrob. Chemother, 2007; 60: 323-327

[Pérez-Trallero E. et al. Antimicrobial susceptibilities of amoxicillin-non-susceptible and susceptible isolates among penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae*.](#)
Clinical Microbiology and Infection, Sept. 2007; Vol. 13, 9: 937-948

[Fenoll A. et al. In vitro activity of oral cephalosporins against pediatric isolates of *Streptococcus pneumoniae* non-susceptible to penicillin, amoxicillin or erythromycin](#)
Journal of Chemotherapy, 2008; vol 20, 2: 175-179

Gracia M. et al. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolates in eight Central, East and Baltic European countries in 2005-2006: results of the Cefditoren Surveillance Study

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008; 61: 1180-1185

Seral C. et al. In vitro activity of cefditoren and other antimicrobial agents against 288 *Streptococcus pneumoniae* and 220 *Haemophilus influenzae* clinical strains isolated in Zaragoza, Spain

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2008 Oct.; 62 (2): 210-5

Sevillano D. et al. Genotypic versus Phenotypic characterization, with respect to β -lactam susceptibility, of *Haemophilus influenzae* isolates exhibiting decreased susceptibility to β -lactam resistance markers

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Jan 2009; 53 (1): 267-270

Gracia M. et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pyogenes* in Central, Eastern, and Baltic European Countries, 2005 to 2006: the cefditoren surveillance program.

Diagnostic Microbiology and Infectious disease, 2009; 64: 52-56

Fenoll A. et al. Susceptibility of recently collected Spanish Pneumococci nonsusceptible to oral penicillin from serotypes not included in the 7-valent conjugate vaccine.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, June 2010; vol 54, 6: 2696-2698

Estudios de farmacodinamia realizados con cefditoren

[Alou L. et al. Are \$\beta\$ -lactam breakpoints adequate to define non-susceptibility for all *Haemophilus influenzae* resistance phenotypes from a pharmacodynamic point of view?](#)

[**Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007 Apr; 59\(4\): 652-7**](#)

[Sevillano D. et al. Effect of human albumin and serum on the in vitro bactericidal activity of cefditoren against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*.](#)

[**Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007; 60:156-158**](#)

[Torrico M. et al. Influence of TEM-1 \$\beta\$ -lactamase on the pharmacodynamic activity of simulated total versus free-drug serum concentrations of Cefditoren \(400milligrams\) versus amoxicillin-clavulanic acid \(2,000/125 milligrams\) against *Haemophilus influenzae* strains exhibiting and N526K mutation in the *ftsI* gene](#)

[**Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007 Oct; 51\(10\): 3699-3706.**](#)

[Sevillano D. et al. High protein binding and cidal activity against penicillin-resistant *S. pneumoniae*: A Cefditoren in vitro pharmacodynamic simulation.](#)

[**Plos One, 2008 July; 3 \(7\): e-2717**](#)

[Sevillano D. et al. \$\beta\$ -lactam activity against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains exhibiting higher amoxicillin versus penicillin minimum inhibitory concentration values: an in vitro pharmacodynamic simulation](#)

[**Chemotherapy 2008; 54: 84-90**](#)

[Cafini F. et al. Enhanced in vivo activity of cefditoren in pre-immunized mice against penicillin-resistant *S. pneumoniae* \(serotypes 6B, 19F and 23F\) in a sepsis model](#)

[**Plos One, 2010 August; 5 \(8\): e-12041**](#)

Estudios sobre ecología bacteriana realizados con cefditoren

[Cafini F. et al. Decrease in bacterial load versus resistance selection of pneumococcal subpopulations by \$\beta\$ -lactam physiological concentrations over time: An in vitro pharmacodynamic simulation](#)

[**Microbial Drug Resistance, 2008; 14 \(1\): 241-249**](#)

[Sevillano D. et al. \$\beta\$ -lactam effect on mixed cultures of common respiratory isolates as an approach to treatment effects on nasopharyngeal bacterial population dynamics.](#)

[**Plos One, December 2008; 3\(12\): e-3846**](#)

[González N. et al. Influence of different resistance traits on the competitive growth of *Haemophilus influenzae* in antibiotic-free medium and selection of resistant populations by different \$\beta\$ -lactams: an in vitro pharmacodynamic approach.](#)

[**Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009; 63:1215-1222**](#)

[González N. et al. Efficacy of simulated cefditoren versus amoxicillin-clavulanate free concentrations in countering intrastrain *ftsI* gene difusión in *Haemophilus influenzae*.](#)

[**Antimicrobial Agents and Chemotherapy, June 2011; 55\(6\): 2788-2794**](#)

DISCUSIÓN

1) FARMACOEPIDEMIOLOGÍA DE LA RESISTENCIA

1.1 Actividad in vitro de cefditoren en la dinámica cambiante de *S. pneumoniae*.

Con el fin de conocer la actividad intrínseca de cefditoren se han realizado varios estudios en distintos países, con muestras procedentes de diversas poblaciones, antes y después de la introducción de la PCV-7, y de forma comparativa a los antibióticos comúnmente utilizados en la comunidad (115-126). La mayoría de ellos estudiaron la actividad intrínseca frente a cepas con distintos grados de sensibilidad a penicilina y mostraron una elevada actividad intrínseca de cefditoren frente a cepas sensibles a penicilina (CMI_{90} de cefditoren $\leq 0,03 - 0,06 \mu\text{g/ml}$), frente a cepas con sensibilidad intermedia a penicilina (CMI_{90} de cefditoren $0,25 - 0,5 \mu\text{g/ml}$) y frente a cepas resistentes a penicilina (CMI_{90} de cefditoren $0,5 - 1 \mu\text{g/ml}$). Los valores de CMI_{90} de cefditoren frente a cepas con sensibilidad intermedia y resistente a penicilina fueron inferiores (mayor actividad intrínseca) que los de los antibióticos comparadores utilizados en los distintos estudios (amoxicilina, cefdinir, cefproxil, cefuroxima, cefixima, ceftibuteno, cefpodoxima, eritromicina, claritromicina, azitromicina....) (117-126). En la mayoría de estos estudios la CMI_{90} de cefditoren frente a cepas con sensibilidad intermedia y resistente a penicilina fue una dilución menor que cefotaxima y, recientemente, en un estudio realizado en Rusia cefditoren mostró una actividad similar a la de otra cefalosporina de tercera generación parenteral, ceftriaxona (125).

Sin embargo, estos estudios centrados en la actividad intrínseca de cefditoren, no proporcionan una visión global de como la sensibilidad a cefditoren ha podido ir variando con el paso del tiempo dependiendo, como para otros β -lactámicos, de la sensibilidad a la penicilina. Se ha observado que en países, como España, donde se

ha introducido la PCV-7, la prevalencia de no-sensibilidad a penicilina ha disminuido en los últimos 10 años.

Comparando datos de distintos periodos de tiempo, antes y después de la introducción de la PCV-7, podemos analizar la evolución de la actividad intrínseca de cefditoren. El estudio epidemiológico ARISE (Antimicrobial Resistance in Southern Europe) realizado en Europa en la era pre - PCV-7 (2000 – 2001) incluyó un elevado número de aislados de los serotipos 6, 9, 14 y 23 (incluidos en la PCV-7 y tradicionalmente ligados a resistencia) que mostraron CMI₅₀/CMI₉₀ para cefditoren de $\leq 0,03/0,5$ µg/ml para aislados españoles (126). En el último estudio SAUCE (Susceptibilidad a los Antibióticos Usados en la Comunidad en España), realizado en 2006-2007 después de la introducción de la PCV-7, los valores de CMI₅₀/CMI₉₀ para cefditoren fueron de $\leq 0,015/0,125$ µg/ml (31). Esta disminución en los valores de CMI₉₀ para cefditoren de cuatro veces desde 2000-2001 hasta 2006-2007, y que podría continuar en los próximos años debido a una mayor cobertura vacunal, presenta implicaciones importantes en la cobertura farmacodinámica de cefditoren frente a *S. pneumoniae*.

De forma simultánea a la disminución en la prevalencia de los serotipos vacunales PCV-7, han aumentado de forma significativa los serotipos no vacunales (22, 28) ocupando el nicho dejado por los serotipos incluidos en la vacuna heptavalente. Determinar la actividad in vitro de cefditoren frente a aislados distribuidos por serotipos es más interesante que hacerlo frente a colecciones no serotipadas de *S. pneumoniae*. En el estudio de Fenoll et al la prevalencia de serotipos no vacunales procedentes de aislados clínicos invasivos durante 2009 fue del 85,3% (127), siendo el 80% de estos serotipos sensibles a la penicilina (CMI₉₀ de cefditoren $\leq 0,06$ µg/ml), y el 20% no sensibles a penicilina, de los cuales el 53,6% pertenecían al serotipo 19A; el 9,8% al serotipo 24F; el 7,0% al serotipo 35B; el 5,4% al serotipo

6A; el 4,4% a los serotipos 11A, 15A y 23B y 11% a otros (127). La actividad intrínseca de cefditoren frente a estos serotipos no vacunales y no sensibles a la penicilina variaba en función del serotipo, con una CMI₉₀ de 1 µg/ml para cepas resistentes a penicilina y de 0,5 µg/ml para cepas con sensibilidad intermedia en el serotipo 19A; de 0,5 µg/ml para el serotipo 11A; de 0,25 µg/ml para los serotipos 35B, 6A y 15A; de 0,12 µg/ml para el serotipo 24F y de 0,06 µg/ml para el serotipo 23B (127).

Según un estudio reciente realizado en España con aislados de cepas invasivas procedentes de niños, es preocupante la aparición de resistencia a penicilina/amoxicilina en determinados secuenciotipos del serotipo 19A. Quedaría por explorar la actividad de cefditoren frente a los secuenciotipos no sensibles a la penicilina, casi el 100% de los aislados, ST276, ST320, ST878, ST2013 y ST4461 que muestran valores de CMI a penicilina de 0,5 µg/ml para los secuenciotipos ST4461 y ST2013, de 1 µg/ml para los secuenciotipos ST878 y ST276, y de 4 µg/ml para el ST320 (128). En otro estudio realizado en Rumania, nueve cepas secuenciotipo ST321 (o el mas cercano con solo una o dos variaciones en el locus), con un nuevo cluster en la PBP2X y un nuevo alelo murM, pertenecientes a los serotipos 23F o 19A, son las cepas neumocócicas más resistentes a los β-lactámicos descritas en la literatura, siendo las CMIs de cefditoren de 4 a 8 µg/ml mientras que las CMIs de penicilina, amoxicilina y cefuroxima estuvieron entre 16 a 64 µg/ml (129).

Ya que los valores de CMI₉₀ de penicilina, mencionados anteriormente en el estudio español, para los secuenciotipos del serotipo 19A son inferiores a los descritos para las cepas rumanas (CMI₉₀ de penicilina 0,5 – 4 µg/ml), se podría esperar una mayor actividad intrínseca de cefditoren frente a estos secuenciotipos del 19A descritos en España (128).

En resumen, los estudios in vitro y estudios epidemiológicos llevados a cabo en diferentes países con cefditoren muestran su elevada actividad intrínseca, superior a la de otros β -lactámicos, la cual podría incrementarse a lo largo del tiempo a medida que la no-sensibilidad a penicilina disminuya por la redistribución de los serotipos como consecuencia de la introducción de la PCV-7 y la ampliación de la cobertura vacunal.

La dinámica evolutiva de los serotipos y de los secuenciotipos dentro de cada serotipo, debido a la naturaleza recombinogénica de los neumococos y a la selección de los clones resistentes, plantea desafíos a cefditoren y al resto de β -lactámicos, que deberían evaluarse mediante continuos estudios epidemiológicos de susceptibilidad antibiótica de serotipos y de secuenciotipos.

1.2 Actividad in vitro de Cefditoren frente a *H. influenzae*.

Tanto los estudios recogidos en esta tesis como las distintas revisiones y estudios epidemiológicos realizados a nivel mundial han mostrado la elevada actividad in vitro de cefditoren frente a todas las poblaciones de *H. influenzae*, con valores de CMI₉₀ generalmente $\leq 0,03$ $\mu\text{g/ml}$ determinada por microdilución siguiendo las recomendaciones del CLSI (31, 115, 117, 119, 120, 130-134).

En todos estos estudios, realizados en cepas β -lactamasa negativa o positiva sin mutaciones en el gen *ftsI*, se han encontrado niveles elevados de sensibilidad para amoxicilina/clavulánico y cefuroxima; sin embargo, cuando se consideraban cepas con mutaciones en el gen *ftsI*, los valores de CMI₉₀ fueron de 4-8 $\mu\text{g/ml}$ para amoxicilina/clavulánico y de 2-16 $\mu\text{g/ml}$ para cefuroxima, a diferencia de los valores de CMI₉₀ de cefditoren que fueron $\leq 0,06$ $\mu\text{g/ml}$ (117, 119, 130, 133) excepto en un

estudio americano donde la CMI₉₀ de cefditoren fue de $\leq 0,25$ µg/ml (134). El número de cepas BLNAR estudiadas en todos ellos fue menor de 25, excepto en uno de los estudios que incluyó un número considerable de cepas BLNAR y BLPACR (130). Este estudio, realizado en España durante 2005-2007, con muestras procedentes de seis hospitales, utilizó criterios genotípicos/fenotípicos en 196 cepas con CMIs a ampicilina ≥ 1 µg/ml o a amoxicilina/clavulánico $\geq 2/1$ µg/ml donde se encontró un mayor índice de BLNAR y BLPACR. De las 196 cepas, 31 (15,8%) no presentaron mutación en el gen *ftsI* (10 β-lactamasa negativa / 21 β-lactamasa positiva) y 165 (84,2%) mostraron mutación en el gen *ftsI*, 121 (73%) BLNAR y 44 (27%) BLPACR. Los valores de CMI₉₀ para las cepas BLNAR fueron de 4, 16 y 0,06 µg/ml para amoxicilina/clavulánico, cefuroxima y cefditoren respectivamente, y de 8, 16, y 0,06 µg/ml para las cepas BLPACR respectivamente (130). Además, las cepas BLPACR mostraban una relación filogenética más próxima que las cepas BLNAR (130).

Estos datos muestran un aumento en la prevalencia de los mecanismos de resistencia no enzimáticos en *H. influenzae* y la necesidad de realizar estudios epidemiológicos, utilizando criterios fenotípicos/genotípicos, para mantener actualizados los datos sobre sensibilidad a los antibióticos más comúnmente utilizados. Los estudios realizados destacan el papel de cefditoren en el tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio adquiridas en la comunidad por *H. influenzae* debido a su elevada actividad intrínseca, no influenciada por los genotipos /fenotipos no sensibles a la ampicilina.

1.3 Actividad in vitro de Cefditoren frente a *S. pyogenes*.

La presión antibiótica cambiante ejercida, durante la última década, ha modificado los patrones de no-sensibilidad en *S. pyogenes*, por un lado con cambios en

fenotipos de no-sensibilidad a macrólidos, siendo la resistencia a los mismos frecuente en algunas áreas geográficas (135) y, por otro lado, ha conducido a la aparición y diseminación de cepas con baja resistencia a fluoroquinolonas en Europa y Norte América (89), sin embargo en todos los estudios realizados *S. pyogenes* sigue siendo, de modo uniforme, sensible a los β -lactámicos.

En el estudio europeo realizado en 763 cepas de *S. pyogenes* recogidas durante un año (2005-2006) en República Checa, Eslovaquia, Hungría, Polonia, Rumanía y Países Bálticos, cefditoren mostró una elevada actividad intrínseca con un valor de $\text{CMI}_{90} \leq 0,03 \text{ } \mu\text{g/ml}$, inferior al resto de antibióticos utilizados como comparadores: penicilina, ampicilina, cefotaxima, eritromicina, claritromicina y levofloxacino (135). Frente a los macrólidos utilizados como comparadores, eritromicina y claritromicina, al igual que en otras publicaciones (85), los fenotipos de resistencia mas frecuentes fueron el MLS_B y el M (135), sin embargo, a diferencia de otros estudios no se encontró resistencia a quinolonas (89, 135). Estos resultados fueron similares a los publicados con cefditoren en otros estudios europeos, con valores de CMI_{90} que fueron de $\leq 0,03 - \leq 0,06 \text{ } \mu\text{g/ml}$ (117, 119) inferiores también a los valores de CMI de antibióticos β -lactámicos utilizados como comparadores, que tuvieron unos valores de $0,06 - 0,06 \text{ } \mu\text{g/ml}$ para penicilina, de $0,06 - 0,12 \text{ } \mu\text{g/ml}$ para amoxicilina, de $0,12 - 0,12 \text{ } \mu\text{g/ml}$ para cefpodoxima y cefuroxima, de $0,12 - 0,25 \text{ } \mu\text{g/ml}$ para cefixima, de $0,5-1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ para ceftibuteno y de $1-2 \text{ } \mu\text{g/ml}$ para cefaclor (117, 119).

Dentro de los β -lactámicos, a los cuales *S. pyogenes* es uniformemente sensible, las cefalosporinas orales con elevada actividad intrínseca frente a *S. pyogenes* y también frente a cepas productoras de β -lactamasa de *H. influenzae*, como es el caso de cefditoren, ofrecen la ventaja frente a la penicilina de contrarrestar la patogenidad indirecta de este gram-negativo (136, 137).

2) FARMACODINAMIA

2.1 Como herramienta predictora de eficacia: Simulaciones farmacodinámicas

Al relacionar de forma matemática el perfil farmacocinético de cefditoren, tras administración a voluntarios sanos de 400 mg en dosis única con comida, con el rango de CMI_s para los patógenos diana, se alcanzaron unos valores de $T > \text{CMI}$ de $\simeq 55\%$ para CMI de 0,5 µg/ml, de $\simeq 68\%$ para CMI de 0,25 µg/ml, de $\simeq 81\%$ para CMI de 0,12 µg/ml y de aproximadamente un 94% para CMI_s de 0,06 µg/ml (114). Sin embargo, como se ha comentado, los antibióticos in vivo interactúan con las bacterias de forma más compleja que in vitro, debido a la presencia de proteínas séricas que actúan como interfase, esto es especialmente importante para cefditoren que presenta un elevado porcentaje de unión a proteínas plasmáticas (88%), principalmente a la albúmina (112). Como se ha descrito, *H. influenzae* y *S. pyogenes* son uniformemente muy sensibles a cefditoren, con $\text{CMI}_{90} \leq 0,06 \text{ µg/ml}$, por tanto las investigaciones sobre el efecto que la unión a proteínas tendrá sobre la actividad antibacteriana de cefditoren se han llevado a cabo utilizando distintas cepas de *S. pneumoniae*, ya que frente a esta especie es donde cefditoren muestra un mayor rango de valores de CMI.

Para evaluar como la unión a proteínas influye en la actividad de cefditoren, se han realizado estudios experimentales, in vitro mediante un simulador e, in vivo mediante un modelo animal.

Para estudiar in vitro el efecto que tiene la presencia de la albúmina humana sobre la actividad de cefditoren se ha utilizado un modelo computerizado de simulación farmacodinámica monocompartimental. El perfil sérico de cefditoren simulado ha sido

el correspondiente a las concentraciones totales conseguidas durante 24h tras la administración de 400 mg bid, utilizando un medio que contenía un 75% suero humano y un 25% de caldo con concentraciones fisiológicas de albúmina humana en el medio de 4,9 g/dl (138). El porcentaje de unión a proteínas de cefditoren utilizado en el simulador fue del 87,1%, similar al descrito en la literatura en voluntarios sanos (112). Se estudio la actividad antibacteriana a lo largo del tiempo (24 horas) en 6 cepas de *S. pneumoniae* no sensibles a penicilina, con CMI's a cefditoren de 0,25 y 0,5 µg/ml y un inóculo inicial que fue de $2-6 \times 10^7$ ufc/ml (138). A las 24h se consiguió una reducción del 99,9% del inóculo inicial (actividad bactericida) para cepas con valores de CMI de 0,25 µg/ml ($T > CMI = 77,6\%$, $fT > CMI = 23,7\%$) mientras que para cepas con CMI de 0,5 µg/ml la reducción del inóculo inicial fue del 52,9% al 96,8% ($T > CMI = 61,6\%$, $fT > CMI = 1,7\%$) (138).

Para investigar los efectos de la unión a proteínas in vivo en la farmacodinamia y eficacia terapéutica de cefditoren se desarrolló un modelo de sepsis en ratón (139). Una característica particular de cefditoren es que el porcentaje de unión a proteínas es similar en ratones y humanos, lo que permite extrapolar la farmacodinamia, para predecir eficacia terapéutica, de modelos animales en ratones a humanos. Se utilizaron 3 aislados clínicos de *S. pneumoniae* con serotipos 6B, 19F, 23F, ya que estos serotipos han sido identificados como factores independientes de mortalidad a 30 días en bacteriemia en humanos (140). Adicionalmente estas tres cepas tenían unas CMI's excepcionalmente altas a cefditoren: 1 µg/ml para el serotipo 6B, 2 µg/ml para el serotipo 19F y 4 µg/ml para el serotipo 23F (139). Los ratones fueron infectados vía intraperitoneal, con un inóculo de 10^7 ufc/ml, 1h antes de iniciar el tratamiento antibiótico con cefditoren (139). Cefditoren fue administrado cada 8h, hasta un total de 6 dosis, empleando dosis crecientes desde 6,25 mg/kg hasta 100 mg/kg y los resultados fueron comparados frente al grupo control sin tratamiento donde se produjo el 100% de mortalidad (139). Los animales fueron evaluados

durante 7 días registrándose la mortalidad. El porcentaje de unión a proteínas en el suero del ratón fue medido de forma experimental, siendo del 86,9%. Se determinó la fracción total $T > CMI$ y libre $fT > CMI$ de cefditoren asociadas a la supervivencia. Valores de $T > CMI$ de $\simeq 35\%$ para fármaco total y de $fT > CMI$ $\simeq 19\%$ para la fracción libre, se correlacionaron con supervivencia del 100% de los animales infectados por cepas con CMI de 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ (139). Sin embargo en animales infectados con cepas con una CMI de 4 $\mu\text{g/ml}$ y tratados con la dosis más alta ensayada (100 mg/kg) se obtuvo un índice de supervivencia del 60% para $T > CMI$ de $\simeq 27\%$ de fármaco total y de $fT > CMI$ de $\simeq 16\%$ para la fracción libre (139).

De acuerdo con los resultados obtenidos en estos estudios, tanto en la simulación farmacodinámica computerizada como en el modelo animal de sepsis, para evaluar el efecto de la unión a proteínas en la actividad de cefditoren, limitar la actividad antibacteriana a la fracción libre de fármaco está lejos de la realidad, ya que la actividad antibacteriana encontrada en nuestros estudios es superior a la que podría predecirse en base a la fracción libre en ambos casos, in vitro e in vivo. En este sentido, en el modelo animal para $T > CMI$ de $\simeq 35\%$ de fármaco total y de $fT > CMI$ $\simeq 19\%$ para la fracción libre, se consiguió un índice de supervivencia del 100% en animales infectados con cepas con CMI 1-2 $\mu\text{g/ml}$ a cefditoren (139), valor para la fracción libre similar al obtenido en la simulación in vitro y que se correlacionaba con una reducción $> 99\%$ del inóculo inicial de aislados clínicos con CMI de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ (138).

Para los β -lactámicos se acepta que valores de $T > CMI$ del 40% se correlacionan bien con éxito terapéutico en humanos (141, 142) y valores del 33% con actividad bacteriostática (143), concepto ligado a la definición de categoría sensible de la FDA y CLSI (definida como inhibición probable del patógeno, con los niveles alcanzables después de la administración de la dosis recomendada) (53, 144). Estos dos valores

porcentuales se aplicaron en una simulación de Montecarlo realizada con concentraciones de cefditoren totales y de fármaco libre extrapolado, determinadas en estudios en Fase I (114), para un rango de CMI_s entre 0,015 y 1 µg/ml (145). Considerando el T>CMI del 33% (objetivo bacteriostático) como objetivo (el valor aproximado de fármaco total ligado al 100% de supervivencia en el modelo animal en sepsis) valores de CMI de hasta 0,5 µg/ml eran cubiertos por cefditoren (145) y al considerar la fracción libre $fT > CMI$ del 33% (valor superior al requerido en el modelo animal para alcanzar 100% de supervivencia y en la simulación farmacodinámica para reducir en más del 99,9% la carga bacteriana) cepas con valores de CMI de hasta 0,25 µg/ml eran cubiertas (145). Sin embargo, si en la simulación de Montecarlo se consideraba el valor teórico clásicamente aceptado de $fT > CMI$ del 40% de la fracción libre, entonces cefditoren cubría cepas con valores de CMI de hasta 0,12 µg/ml (145).

De acuerdo con todos estos datos, el punto de corte de sensibilidad para cefditoren debería estar entre $\leq 0,12$ µg/ml y $\leq 0,5$ µg/ml. Este último valor de 0,5 µg/ml ha sido propuesto por varios autores considerando la farmacocinética de cefditoren y que los valores CMI₉₀ de cefditoren son inferiores a los de cefalosporinas parenterales de tercera generación (146-148) y de hecho, fue el punto de corte aprobado en el registro europeo en el año 2004 (España, Italia, Grecia, Portugal y Luxemburgo), y que figura en la ficha técnica (sensibilidad $\leq 0,5$ µg/ml) (149).

Incluso considerando el punto de corte más restrictivo para cefditoren $\leq 0,12$ µg/ml, y que figura en la ficha técnica americana autorizada por la FDA en el año 2001, el 100% de los aislados de *S. pyogenes*, casi el 100% de los aislados de *H. influenzae* y aproximadamente el 95% de las cepas de *S. pneumoniae*, recogidos durante el último estudio epidemiológico SAUCE, serían sensibles a cefditoren (31).

2.2 Como herramienta para contrarrestar la resistencia.

Optimizar la terapia no solo implica mejores resultados terapéuticos, también significa disminuir el riesgo de que aparezca resistencia durante el tratamiento, tanto en el patógeno como en flora normal. Mientras que el resultado terapéutico es un tema individual, la aparición de resistencia y su posterior difusión tendrá efectos ecológicos en toda la población.

El impacto que tendrán los distintos regímenes de dosificación de antibióticos en el desarrollo de resistencias no ha sido una prioridad en la fase de desarrollo de los fármacos, con la mayoría de los índices PK/PD centrados en la eficacia microbiológica y los subsiguientes resultados clínicos (109). Estudios que investiguen la capacidad de los antibióticos para hacer frente a la selección de resistencia, principalmente dentro de la microbiota bacteriana presente en el tracto de la nasofaringe, son importantes ya que es donde aparecen las resistencias y desde donde posteriormente esos microorganismos serán seleccionados y diseminados.

En la orofaringe existe un intrincado equilibrio entre los patógenos adaptados al ser humano (*S. pyogenes*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*) y el resto de flora nasofaríngea (150). De acuerdo con diferentes estudios, el porcentaje de portadores de *S. pyogenes* en garganta en niños en edad escolar es del 15-20%, en los períodos estacionales de mayor prevalencia (71, 72), los portadores de *S. pneumoniae* van del 10 - 40% dependiendo de la edad (151) y hasta el 80% de los individuos sanos son portadores del *H. influenzae* (152), con múltiples cepas en el 50% de los casos positivos (153) y un elevado índice de rotación de las cepas (154). Esta es la base que los antibióticos pueden alterar mediante la selección de poblaciones específicas resistentes que ya existían previamente pero en pequeño

número, en ausencia de la presión antibiótica, debido al “coste evolutivo” de la resistencia.

Los diferentes estudios realizados han puesto de manifiesto la capacidad de cefditoren para hacer frente a la selección de resistencias mostrando diferencias entre los datos disponibles para cefditoren y para otros antibióticos.

2.2.1 Dentro de la misma cepa

Un estudio reciente realizado in vitro por Takahata S et al, puso de manifiesto que el mecanismo de transferencia in vitro del gen *ftsI* implicaba una transformación clásica (155), *H. influenzae* es capaz, de forma natural, de tomar ADN del entorno.

Para investigar la capacidad de cefditoren para contrarrestar la difusión intra-cepa de la resistencia ligada a la mutación del gen *ftsI* se ha llevado a cabo una simulación computerizada bicompartimental de forma comparativa con amoxicilina/clavulánico. Durante 24h se simularon concentraciones libres de 400 mg bid de cefditoren frente a 875/125 mg tid de amoxicilina/clavulánico. La mezcla de cepas salvajes y de subpoblaciones recombinadas se consiguió permitiendo la transformación mediante 3h de incubación de ADN extraído de una cepa BLNAR (ó BPLACR) con el aislado de cepas salvajes (cepa receptora). Esta mezcla (inóculo inicial 10^7 ufc/ml) se introdujo en el simulador y se midieron las poblaciones totales y recombinadas derivadas de la difusión intra-cepa del gen *ftsI* en cepas de *H. influenzae* β -lactamasa positiva y β -lactamasa negativa (156). En simulaciones sin antibiótico, las subpoblaciones recombinadas de cepas β -lactamasa negativa aumentaron a lo largo del tiempo mostrando una buena capacidad de adaptación (buen “fitness”), sin embargo, estas subpoblaciones recombinadas no aumentaron en presencia de concentraciones

fisiológicas de la fracción libre de amoxicilina/clavulánico, o fueron muy pequeñas o indetectables a las 24h, ($fT > CMI$ del 30,7% para la población recombinada) lo que sugiere que la mutación en el gen *ftsI* no ofrece ninguna ventaja competitiva (156). En el caso de la cepa de *H. influenzae* β -lactamasa positiva en simulaciones sin antibiótico, la subpoblación recombinada no aumento o incluso disminuyó, pero en simulaciones con amoxicilina/clavulánico esta subpoblación paso del 0,00095% a las 0h hasta el 6% o al 32% a las 24h en simulación con ADN de cepas BLNAR y BLPACR respectivamente ($fT > CMI$ de 0% para las poblaciones recombinadas) (156). Por tanto, la acumulación de los dos determinantes de resistencia, mutación en el gen *ftsI* y producción de β -lactamasa en la población recombinada, ofreció una ventaja competitiva en presencia de amoxicilina/clavulánico. Por el contrario, en las simulaciones con cefditoren utilizando concentraciones fisiológicas de fármaco libre no se encontraron poblaciones recombinadas a las 24h, con valores altos de $fT > CMI$, ($>83\%$), frente a las cepas donantes o receptoras (156).

Desde la perspectiva farmacodinámica este modelo in vitro demuestra que son necesarios valores $fT > CMI$ de la fracción libre de antibiótico superiores a los clásicamente considerados para la predicción de la respuesta bacteriológica, si queremos contrarrestar la difusión intra-cepa del gen *ftsI*, ya que deben cubrir cualquier posible subpoblación recombinada (156).

Antibióticos como cefditoren con elevada actividad intrínseca frente a *H. influenzae*, con independencia de su genotipo de resistencia, muestran potencial para hacer frente a las subpoblaciones recombinantes, al limitar la difusión intra-cepa con la consecuente ventaja epidemiológica.

2.2.2 Nichos multibacterianos de la misma especie

Una vez que aparecen cepas con diferentes determinantes de resistencia, los antibióticos pueden alterar la dinámica bacteriana seleccionando determinadas cepas. Mediante simulación computerizada bicompartimental se estudió la influencia de los distintos determinantes de resistencia en el crecimiento competitivo de *H. influenzae* (157) y de *S. pneumoniae* (158), tanto en ausencia como en presencia de antibióticos

- Nicho multibacteriano de *H. influenzae*

En el modelo de simulación bicompartimental se estudió la capacidad de cefditoren frente a amoxicilina/clavulánico y cefuroxima para hacer frente a la selección de cepas resistentes de *H. influenzae* con mutaciones en el gen *ftsI* en un nicho multicepa, utilizando un inóculo inicial 4×10^6 ufc/ml, compuesto por cuatro cepas, 1 β -lactamasa negativa, 1 β -lactamasa positiva, 1 BLNAR y 1 BLPACR en proporción 1:1:1:1 (157). Se simularon concentraciones antibióticas de la fracción libre resultante de administrar 400 mg bid de cefditoren, 875/125 mg tid amoxicilina/clavulánico y 500 mg bid cefuroxima (157).

En las simulaciones sin antibióticos la frecuencia de la cepa BLPACR portadora de ambos determinantes de resistencia (mutación gen *ftsI* y producción β -lactamasa) era de solamente un 1% a las 24 h a diferencia de la frecuencia de cepas sin determinantes de resistencia que era del 90% (cepa β -lactamasa negativa) (157). Como ocurría en el estudio realizado en subpoblaciones intra-cepa (156), estos resultados demuestran que la acumulación de resistencia, enzimática y no enzimática, tiene una influencia negativa en el "fitness" bacteriano en ausencia de antibióticos.

En presencia de antibióticos la cepa BLPACR era la predominante a las 24h. La actividad de cefditoren fue significativamente superior a la de los dos comparadores estudiados, principalmente debido a las diferencias obtenidas en la reducción de poblaciones BLNAR y BLPACR (157). Estas diferencias se asociaron con $fT > CMI < 20\%$ para amoxicilina/clavulánico y 0% para cefuroxima frente a cepas BLNAR y BLPACR, mientras que los valores de cefditoren fueron $fT > CMI > 67\%$ frente a todas las cepas (157). Estos resultados sugieren que los tratamientos antibióticos desenmascaran poblaciones con determinantes de resistencia específicos en una magnitud que depende de su capacidad para reducir el inóculo y de los valores de los parámetros farmacodinámicos frente a las diferentes cepas presentes en el inóculo mixto.

En este modelo de simulación antibióticos como cefditoren, cuya CMI no varía por la presencia de β -lactamasas ni por la presencia de mutaciones en el gen *ftsI* (157), son útiles para contrarrestar la selección de cepas resistentes en nichos multibacterianos.

- Nicho multibacteriano de *S. pneumoniae*

En el caso de *S. pneumoniae* se simuló mediante un modelo computerizado bicompartimental, un nicho multicepa de 4 cepas con distintos genotipos de resistencia: serotipo 19A (tet M), serotipo 4 (pbp1a, gyrA y parC), serotipo 19F (pbp1a, pbp2x y ermB) y serotipo 23F (pbp1a, pbp2x, pbp2b-10 cambios mutacionales y CAT) (158). El inóculo inicial fue de $4-8 \times 10^6$ μ fc/ml con una distribución entre las cepas de 1:1:1:1. Durante 24h se simularon concentraciones de fármaco libre, correspondientes a la administración de 400 mg bid de cefditoren, 500 mg bid de cefuroxima, 400 mg de cefixima od, 500 mg bid de cefaclor y 875 mg bid

de amoxicilina (158). Antes y después de la simulación se analizó el perfil de la población usando placas con diferentes concentraciones de amoxicilina (158).

En las simulaciones sin antibiótico, el peor resultado de supervivencia correspondió a la cepa portadora de múltiples rasgos de resistencia serotipo 23F que desapareció a las 10h, mientras que la mayoría de la población final correspondía al serotipo 4 con poblaciones marginales de los serotipos 19A y 19F. Al igual que para *H. influenzae*, en ausencia de presión antibiótica, la acumulación de determinantes genéticos de resistencia tiene un alto coste evolutivo en términos de supervivencia, influyendo en el crecimiento competitivo de las cepas de la misma especie.

En las simulaciones en presencia de antibiótico, todas las cepas sensibles a penicilina/amoxicilina fueron erradicadas, serotipos 19A y 4; $T > CMI \geq 43\%$, mientras que las otras dos cepas resistentes a la amoxicilina mostraron diferentes evoluciones en función del antibiótico usado:

- a) Cefditoren disminuyó $> 2 \log_{10}$ del inóculo mixto inicial ($T > CMI \geq 45\%$) a las 12-24h. Las poblaciones supervivientes crecieron en las placas con una concentración $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ de amoxicilina.
- b) Las otras cefalosporinas orales no produjeron ninguna reducción en el inóculo inicial a las 12-24h ($T > CMI = 0\%$) con subpoblaciones menores creciendo en las placas con concentración $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ de amoxicilina.
- c) La amoxicilina disminuyó un $2,6 \log_{10}$ del inóculo inicial a las 12h ($T > CMI = 47,5\%$), a las 24 h se produjo un incremento de $1,1 \log_{10}$ sobre el inóculo inicial con una población significativa creciendo en las placas con una concentración $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ de amoxicilina (158).

Este estudio demuestra que una actividad antibiótica uniforme frente a distintas cepas de *S. pneumoniae*, como ya vimos en *H. influenzae*, limita la posible selección

de poblaciones resistentes (158). En el caso de *S. pneumoniae* donde la resistencia o disminución de sensibilidad a amoxicilina es un problema dentro de las cepas resistentes a la penicilina, es necesario disponer de antibióticos con la menor capacidad de seleccionar poblaciones resistentes.

2.2.3 Nichos multibacterianos de distintas especies.

Mediante simulación computerizada bicompartimental, el estudio experimental realizado utilizó un inóculo mixto 1:1:1:1 de 4×10^6 ufc/ml compuesto por *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* resistente a penicilina, *H. influenzae* β -lactamasa positivo y *H. influenzae* BLPACR (159).

En condiciones sin antibiótico, a las 24h, el 96,3% de la población correspondía a *S. pyogenes*, el 3,2% a *H. influenzae* β -lactamasa positiva y 0,5% a *S. pneumoniae*, siendo indetectable la cepa BLPACR (159).

En las simulaciones en presencia de antibióticos la situación era diferente. El inóculo mixto inicial fue expuesto a las concentraciones libres de los distintos antibióticos utilizados: cefditoren 400 mg bid, amoxicilina 875 mg tid y amoxicilina/clavulánico 875/125 mg tid (159). En simulaciones con amoxicilina la producción de β -lactamasa por las cepas de *H. influenzae* impidió la erradicación de cepas estreptocócicas (*S. pyogenes* y *S. pneumoniae*) mediante la degradación de amoxicilina, disminuyendo $\overline{AT} > CMI$ desde un 100% en simulaciones sin bacterias a un 25% en simulaciones con inóculo mixto para *S. pyogenes* y desde un 43% a un 18% para *S. pneumoniae* (159). La presencia del ácido clavulánico en las simulaciones con amoxicilina/clavulánico descartó la patogenicidad indirecta del *H. influenzae*

(ausencia de erradicación de *S. pyogenes*) al proteger la degradación de la amoxicilina y *S. pyogenes* fue erradicado ($fT > MIC$ del 100% en las simulaciones del inóculo mixto) (159). Sin embargo, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* β -lactamasa positivo fueron seleccionados independientemente de su sensibilidad a amoxicilina/clavulánico (CMI = 2/1 μ g/ml en ambos casos). Esto podría estar asociado a una disminución en el valor $fT > CMI$ de amoxicilina desde $\approx 41\%$ en simulaciones libres de bacterias a un 33% en simulaciones con inóculo mixto debido a la degradación parcial de amoxicilina por las β -lactamasas producidas por la cepa BLPACR (resistente a amoxicilina/clavulánico) (159), no siendo la concentración de ácido clavulánico capaz de contrarrestar completamente la producción de β -lactamasas. En el caso de cefditoren, tanto las dos cepas de *H. influenzae* como la de *S. pyogenes* fueron erradicadas ($fT > CMI \geq 58\%$) y para *S. pneumoniae* se produjo una reducción de $2\log_{10}$ ($fT > CMI$ de $\approx 26\%$) (159).

Según los resultados de este estudio, el contrarrestar la co-patogenicidad parece ser gradual ya que los inhibidores de β -lactamasa, caso del ácido clavulánico, pudieron contrarrestarla en cepas sensibles, como en el caso de *S. pyogenes*, pero no pudieron hacerlo en *S. pneumoniae*, mucho menos sensible y por tanto, fue seleccionado. Esto sugiere que, al menos in-vitro, cefditoren que es resistente a la acción de β -lactamasas producidas por cepas con y sin mutaciones en el gen *ftsI* ofrece la ventaja de contrarrestar la co-patogenicidad.

CONCLUSIONES

MICROBIOLÓGICAS:

1- Cefditoren ha mostrado una elevada actividad intrínseca frente a los aislamientos más prevalentes en la infección respiratoria en la comunidad, con valores de CMI₉₀ para *S. pyogenes* $\leq 0,03$ µg/ml, para *H. influenzae* $\leq 0,06$ µg/ml y para *S. pneumoniae* $\leq 0,5$ µg/ml

2- En relación con los genotipos/fenotipos de resistencia emergentes, poco frecuentes durante el desarrollo clínico, cefditoren ha mostrado unos valores de CMI₉₀ $\leq 0,06$ µg/ml frente a aislados de *H. Influenzae* BLNAR o BLPACR, de 0,25 a 0,5 µg/ml frente a aislados de *S. pneumoniae* con resistencia intermedia a la penicilina y de 0,5 a 1 µg/ml frente a los resistentes a penicilina.

FARMACODINÁMICAS

3- En la simulación farmacodinámica realizada utilizando un modelo monocompartimental y un medio con concentraciones fisiológicas de albúmina humana, cefditoren mostró actividad bactericida frente a cepas de *S. pneumoniae* con CMI de 0,25 µg/ml con unos valores de T>CMI del 77,6% con fármaco total y del 23,7% para la fracción libre y frente a cepas con una CMI de 0,5 µg/ml, la actividad bactericida se consiguió con unos valores de T>CMI del 61,6% con fármaco total y del 1,7% con la fracción libre. Desde una perspectiva farmacodinámica la presencia de concentraciones fisiológicas de albúmina no impide la actividad de cefditoren, a pesar de su elevada unión a proteínas plasmáticas.

4 – En el modelo animal de sepsis utilizando aislados resistentes a la penicilina, los valores alcanzados con cefditoren de T>CMI del 35% con fármaco total y del 19% con la fracción libre se asociaron con el 100% de supervivencia

5 – A pesar de la elevada unión a proteínas plasmáticas de cefditoren, un 88%, los resultados sugieren que la actividad antibacteriana es superior a la que correspondería a la fracción libre de antibiótico.

SOBRE ECOLOGÍA

6 - Cefditoren ha mostrado su capacidad para contrarrestar la difusión intra cepa de gen *ftsI* en *H. influenzae*, debido a su elevada actividad intrínseca con independencia del genotipo de resistencia.

7 – En nichos multibacterianos de *S. pneumoniae* con distintos genotipos de resistencia, cefditoren fue el β -lactámico con la menor capacidad de selección de cepas resistentes.

8 – En nichos multibacterianos de *H. influenzae* con distintos genotipos de resistencia, cefditoren fue el β -lactámico con la menor capacidad de selección de cepas resistentes.

9 – En nichos multibacterianos de diferentes especies (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *S. pyogenes*) simulando la nasofaringe, cefditoren, por ser resistente a la acción de las β -lactamasas, presentó una actividad antibacteriana no influida por el patógeno indirecto (co-patogenicidad) a diferencia de la amoxicilina.

10 - Los estudios recogidos en esta tesis muestran que con una red de investigadores adecuada pueden realizarse en nuestro país estudios de susceptibilidad, farmacodinamia y ecología que, más allá de los exigidos por las Autoridades Reguladoras, proporcionan datos sobre los distintos aspectos de la actividad de un antibiótico, apuntando la investigación que sería deseable realizar con nuevos antibióticos antes de su comercialización y durante la misma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baquero F, Coque TM, de la Cruz F, Eco-Evo Drugs and Strategies: The Need for Novel Tools to Fight Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 May 16.
2. Brown SP, West SA, Diggle SP, Griffin AS. Social evolution in micro-organisms and a Trojan horse approach to medical intervention strategies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009; 364: 3157-68
3. MacGowan AP. Elements of design: the knowledge on which we build. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 (suppl 2): 6-11
4. Drusano GL. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of 'bug and drug'. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:289-300
5. Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 391-408
6. Ferrano MJ. Should we reevaluate antibiotic breakpoints? *Clin Infect Dis* 2001; 33 (suppl 3): S227-S229.
7. Metlay Jp, Powers JH, Dudley MN, Christiansen K, Finch RG. Antimicrobial drug resistance, regulation and research. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 183-190
8. Mueller M, de la Peña A, Derendorf H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of antiinfective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 369-377.
9. Firsov AA, Vostrov SN, Lubenko IY, Drlica K, Portnoy YA, Zinder SH. In vitro pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hipótesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1604-1613
10. Sevillano D, Calvo A, Giménez Mj, Alou L, Aguilar L, Valero E, et al. Bactericidal activity of amoxicillin against non-sensible *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacodynamic model simulating the concentrations obtained with the 2000/125 mg sustained-release co-amoxiclav formulation. *Antimicrob Chemother* 2004; 54: 1148-1151

11. Alou L, Giménez MJ, Sevillano D, Aguilar L, Cafini F, Echeverría O, et al. A pharmacodynamic approach to antimicrobial activity in serum and epithelial lining fluid against in vivo-selected *Streptococcus pneumoniae* mutants and association with clinical failure in pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 349-358
12. Sevillano D, Alou L, Aguilar L, Echeverría O, Jiménez MJ, Prieto J. Azithromycin iv pharmacodynamic parameters predicting *Streptococcus pneumoniae* killing in epithelial living fluid versus serum: an in vitro pharmacodynamic simulation. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:1128-1133
13. Alou L, Aguilar L, Sevillano D, Giménez MJ, Echeverría O, Gómez-Lus ML, et al. Is there a pharmacodynamic need for the use of continuous versus intermittent infusion with ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa*? An in vitro pharmacodynamic model. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:209-213
14. Nuermberger EL, Bishai WR. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*: what does the future hold?. *Clin Infect Dis* 2004; 38(suppl 4): S363-S371
15. MacGowan A, Bowker K. Development in pk/pd: optimizing efficacy and prevention of resistance. A critical review of pk/pd in in vitro models. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 291-298
16. MacGowan A, Rogers C, Holt HA, Wootton M, Bowker K. Assessment of different antimicrobial effect measures used in in-vitro models of infection and subsequent use in pharmacodynamic correlations for moxifloxacin. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 73-78
17. Martin M, Gomez-Lus ML, Aguilar L, Martinez P, Gimenez MJ, Prieto J. Effect of clavulanic acid and/or polymorphonuclear neutrophils on amoxicillin bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 512-516
18. Gomez-Lus ML, Aguilar L, Martin M, Gimenez MJ, Martinez P, Prieto J. Intracellular and extracellular killing of a penicillin-resistant, serotype-9 strain of

Streptococcus pneumoniae by polymorphonuclear leukocytes in the presence of sub-inhibitory concentrations of clavulanic acid. *Antimicrob Chemother* 1997; 40: 142-144

19. Casal J, Gimenez MJ, Aguilar L, Yuste J, Jado I, Tarrago D et al. Beta-lactam activity against resistant pneumococcal strains is enhanced by the immune system. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50 (suppl S2): 83-86
20. Alou L, Aguilar L, Gimenez MJ, Torrico M, Sevillano D. Activity of serum concentrations of daptomycin vs. vancomycin against vancomycin sensible and resistant *Enterococcus faecium* in the presence of albumin physiological concentrations: an in vitro pharmacodynamic simulation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008 ; 27: 1009-11
21. Varon E, Mainardi JL, Gutmann L. *Streptococcus pneumoniae*: still a major pathogen. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 401.
22. Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, Giménez MJ, Aragoneses-Fenoll L, Hanquet G, Casal J, Tarragó D. Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1012-20.
23. Scott JA, Hall AJ, Dagan R, Dixon JM, Eykyn SJ, Fenoll A, Hortal M, Jetté LP, Jorgensen JH, Lamothe F, Latorre C, Macfarlane JT, Shlaes DM, Smart LE, Taunay A. Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: associations with age, sex, and geography in 7,000 episodes of invasive disease. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 973-81.
24. Felmingham D, Reinert RR, Hirakata Y, Rodloff A. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT surveillance study, and comparative in vitro activity of the ketolide, telithromycin. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 50 Suppl S1: 25-37.

25. Cantón R, Unal S, Farrell DJ. Antibacterial resistance patterns in *Streptococcus pneumoniae* isolated from elderly patients: PROTEKT years 1-5 (1999-2004). Int J Antimicrob Agents 2007; 30: 546-50.
26. Pulido M, Sorvillo F. Declining invasive pneumococcal disease mortality in the United States, 1990-2005. Vaccine. 2010; 28: 889-92.
27. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, Reingold A, Cieslak PR, Pilishvili T, Jackson D, Facklam RR, Jorgensen JH, Schuchat A; Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. N Engl J Med 2003; 348: 1737-46.
28. Fenoll A, Aguilar L, Granizo JJ, Giménez MJ, Aragoneses-Fenoll L, Mendez C, Tarragó D. Has the licensing of respiratory quinolones for adults and the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV-7) for children had herd effects with respect to antimicrobial non-susceptibility in invasive *Streptococcus pneumoniae*?. J Antimicrob Chemother 2008; 62: 1430-3.
29. Grupo de Trabajo de la Ponencia de Registro y Programa de Vacunas. 2006. Enfermedad invasora por *Streptococcus pneumoniae*. Implicación de la vacunación con la vacuna conjugada heptavalente. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain.
30. Pérez-Trallero E, García-de-la-Fuente C, García-Rey C, Baquero F, Aguilar L, Dal-Ré R, García-de-Lomas J; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Geographical and ecological analysis of resistance, coresistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 1965-72.
31. Pérez-Trallero E, Martín-Herrero JE, Mazón A, García-Delafuente C, Robles P, Iriarte V, Dal-Ré R, García-de-Lomas J; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrobial resistance among respiratory pathogens in

- Spain: latest data and changes over 11 years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2953-9.
32. McGee L. The coming of age of niche vaccines? Effect of vaccines on resistance profiles in *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Opin Microbiol*. 2007; 10: 473-8.
 33. Picazo J, Ruiz-Contreras J, Casado-Flores J, Giangaspro E, Del Castillo F, Hernández-Sampelayo T, Otheo E, Balboa F, Ríos E, Méndez C; Heracles Study Group. Relationship between serotypes, age, and clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Madrid, Spain, after introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine into the vaccination calendar. *Clin Vaccine Immunol*. 2011; 18: 89-94.
 34. Ardanuy C, Rolo D, Fenoll A, Tarrago D, Calatayud L, Liñares J. Emergence of a multidrug-resistant clone (ST320) among invasive serotype 19A pneumococci in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 64: 507-10.
 35. Picazo J, Ruiz-Contreras J, Hernandez B, Sanz F, Gutierrez A, Cercenado E, Meseguer MA, Delgado-Iribarren A, Rodriguez-Avial I, Méndez C. Clonal and clinical profile of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A causing pediatric invasive infections: a 2-year (2007-2009) laboratory-based surveillance in Madrid. *Vaccine*. 2011; 29: 1770-6.
 36. Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev*. 2006; 30: 673-91.
 37. Morris SK, Moss WJ, Halsey N. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine use and effectiveness. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 435-43.
 38. Erwin AL, Smith AL. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol* 2007; 15: 355-62.
 39. Murphy TF, Faden H, Bakaletz LO, Kyd JM, Forsgren A, Campos J, Virji M, Pelton SI. Nontypeable *Haemophilus influenzae* as a pathogen in children. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28: 43-8.

40. Murphy TF. *Haemophilus* infections. In: Mandell GL, Bennett JE and Dolin R (eds), Mandell, Douglas, Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Elsevier Inc., Philadelphia, PA, 2005.
41. St Sauver J, Marrs CF, Foxman B, Somsel P, Madera R, Gilsdorf JR. Risk factors for otitis media and carriage of multiple strains of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. Emerg Infect Dis 2000; 6: 622-30.
42. Margolis E, Yates A, Levin BR. The ecology of nasal colonization of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*: the role of competition and interactions with host's immune response. BMC Microbiol 2010; 10: 59.
43. Block SL, Hedrick J, Harrison CJ, Tyler R, Smith A, Findlay R, Keegan E. Community-wide vaccination with the heptavalent pneumococcal conjugate significantly alters the microbiology of acute otitis media. Pediatr Infect Dis J 2004; 23: 829-33.
44. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. Tonawanda/Williamsville Pediatrics. J Infect Dis 1997; 175: 1440-5.
45. Hallström T, Riesbeck K. *Haemophilus influenzae* and the complement system. Trends Microbiol 2010; 18 :258-65.
46. Murphy TF, Sethi S, Klingman KL, Brueggemann AB, Doern GV. Simultaneous respiratory tract colonization by multiple strains of nontypeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease: implications for antibiotic therapy. J Infect Dis 1999; 180: 404-9.
47. Murphy TF. The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Curr Opin Infect Dis 2006; 19: 225-30.
48. Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med 2002; 347: 465-71.

49. Campos J, Garcia-Tornel S, Sanfeliu I. Susceptibility studies of multiply resistant *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric patients and contacts. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 706-9.
50. San Millan A, Garcia-Cobos S, Escudero JA, Hidalgo L, Gutierrez B, Carrilero L, Campos J, Gonzalez-Zorn B. *Haemophilus influenzae* clinical isolates with plasmid pB1000 bearing bla_{ROB-1}: fitness cost and interspecies dissemination. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1506-11.
51. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 368-89.
52. Bell SM, Plowman D. Mechanisms of ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* from respiratory tract. *Lancet* 1980; 1: 279-80.
53. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2009.
54. Matic V, Bozdogan B, Jacobs MR, Ubukata K, Appelbaum PC. Contribution of beta-lactamase and PBP amino acid substitutions to amoxicillin/clavulanate resistance in beta-lactamase-positive, amoxicillin/clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 1018-21.
55. Albritton WL, Setlow JK, Slaney L. Transfer of *Haemophilus influenzae* chromosomal genes by cell-to-cell contact. *J Bacteriol* 1982; 152: 1066-70.
56. Takahata S, Ida T, Senju N, Sanbongi Y, Miyata A, Maebashi K, Hoshiko S. Horizontal gene transfer of *ftsI*, encoding penicillin-binding protein 3, in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1589-95.
57. García-Cobos S, Campos J, Lázaro E, Román F, Cercenado E, García-Rey C, Pérez-Vázquez M, Oteo J, de Abajo F. Ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates

with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2564-73.

58. Sahm DF, Brown NP, Thornsberry C, Jones ME. Antimicrobial susceptibility profiles among common respiratory tract pathogens: a GLOBAL perspective. *Postgrad Med* 2008; 120(3 Suppl 1): 16-24.
59. Sahm DF, Brown NP, Draghi DC, Evangelista AT, Yee YC, Thornsberry C. Tracking resistance among bacterial respiratory tract pathogens: summary of findings of the TRUST Surveillance Initiative, 2001-2005. *Postgrad Med* 2008; 120(3 Suppl 1): 8-15.
60. Jansen WT, Verel A, Beitsma M, Verhoef J, Milatovic D. Longitudinal European surveillance study of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 873-877.
61. Darabi A, Hocquet D, Dowzicky MJ. Antimicrobial activity against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* collected globally between 2004 and 2008 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67: 78-86.
62. Witherden EA, Montgomery J, Henderson B, Tristram SG. Prevalence and genotypic characteristics of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in Australia. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1013-5.
63. Dabernat H, Seguy M, Faucon G, Delmas C. [Epidemiology of *Haemophilus influenzae* strains identified in 2001 in France, and assessment of their susceptibility to beta-lactams]. [Article in French]. *Med Mal Infect* 2004; 34: 97-101.
64. Jansen WT, Verel A, Beitsma M, Verhoef J, Milatovic D. Surveillance study of the susceptibility of *Haemophilus influenzae* to various antibacterial agents in Europe and Canada. *Curr Med Res Opin* 2008; 24: 2853-61.
65. Goto H, Shimada K, Ikemoto H, Oguri T; Study Group on Antimicrobial Susceptibility of Pathogens Isolated from Respiratory Infections. Antimicrobial

susceptibility of pathogens isolated from more than 10,000 patients with infectious respiratory diseases: a 25-year longitudinal study. *J Infect Chemother* 2009; 15: 347-60.

66. Sawada K, Sato H, Arima M, Hoshino T. [Susceptibility testing for *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric cases during 2004-2008]. [Article in Japanese]. *Kansenshogaku Zasshi* 2010; 84: 441-8.
67. Kishii K, Chiba N, Morozumi M, Hamano-Hasegawa K, Kurokawa I, Masaki J, Ubukata K. Diverse mutations in the *ftsI* gene in ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with acute otitis media. *J Infect Chemother* 2010; 16: 87-93.
68. Ito M, Hotomi M, Maruyama Y, Hatano M, Sugimoto H, Yoshizaki T, Yamanaka N. Clonal spread of beta-lactamase-producing amoxicillin-clavulanate-resistant (BLPACR) strains of non-typeable *Haemophilus influenzae* among young children attending a day care in Japan. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; 74: 901-6.
69. Musser JM, Shelburne SA 3rd. A decade of molecular pathogenomic analysis of group A *Streptococcus*. *J Clin Invest* 2009; 119: 2455-63.
70. Bessen DE. Population biology of the human restricted pathogen, *Streptococcus pyogenes*. *Infect Genet Evol* 2009; 9: 581-93.
71. Bisno AL, Stevens DL. *Streptococcus pyogenes*. In: Mandell GL, Bennett JE and Dolin R (eds), *Mandell, Douglas, Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th ed. Elsevier Inc., Philadelphia, PA, 2005.
72. Shaikh N, Leonard E, Martin JM. Prevalence of streptococcal pharyngitis and streptococcal carriage in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 2010; 126:e557-64.
73. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 685-94.

74. Stollerman GH, Dale JB. The importance of the group A streptococcus capsule in the pathogenesis of human infections: a historical perspective. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1038-45.
75. Passàli D, Lauriello M, Passàli GC, Passàli FM, Bellussi L. Group A streptococcus and its antibiotic resistance. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2007; 27: 27-32.
76. Aziz RK, Kotb M. Rise and persistence of global M1T1 clone of *Streptococcus pyogenes*. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1511-7.
77. Baquero F, Blázquez J. Evolution of antibiotic resistance. *Trends Ecol Evol* 1997; 12: 482-7.
78. Granizo JJ, Aguilar L, Casal J, Dal-Ré R, Baquero F. *Streptococcus pyogenes* resistance to erythromycin in relation to macrolide consumption in Spain (1986-1997). *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 959-64.
79. Kataja J, Huovinen P, Muotiala A, Vuopio-Varkila J, Efstratiou A, Hallas G, Seppälä H. Clonal spread of group A streptococcus with the new type of erythromycin resistance. Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *J Infect Dis* 1998; 177: 786-9.
80. Seppälä H, Klaukka T, Lehtonen R, Nenonen E, Huovinen P. Outpatient use of erythromycin: link to increased erythromycin resistance in group A streptococci. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 1378-85.
81. Albertí S, García-Rey C, Domínguez MA, Aguilar L, Cercenado E, Gobernado M, García-Perea A; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Survey of *emm* gene sequences from pharyngeal *Streptococcus pyogenes* isolates collected in Spain and their relationship with erythromycin susceptibility. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2385-90.
82. Ardanuy C, Domenech A, Rolo D, Calatayud L, Tubau F, Ayats J, Martín R, Liñares J. Molecular characterization of macrolide- and multidrug-resistant *Streptococcus pyogenes* isolated from adult patients in Barcelona, Spain (1993-2008). *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 634-43.

83. Richter SS, Heilmann KP, Beekmann SE, Miller NJ, Miller AL, Rice CL, Doern CD, Reid SD, Doern GV. Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in the United States, 2002-2003. Clin Infect Dis 2005; 41: 599-608.
84. Chan JC, Chu YW, Chu MY, Cheung TK, Lo JY. Epidemiological analysis of *Streptococcus pyogenes* infections in Hong Kong. Pathology 2009; 41: 681-6.
85. Bley C, van der Linden M, Reinert RR. *mef(A)* is the predominant macrolide resistance determinant in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in Germany. Int J Antimicrob Agents 2011; 37: 425-31.
86. Prieto J, Calvo A, Gómez-Lus ML. Antimicrobial resistance: a class effect?. J Antimicrob Chemother 2002; 50 (Suppl S2): 7-12.
87. Martin-Herrero JE, Garcia-Rey C, Dal-Ré R, Aguilar L. Clinical and bacteriological implications of macrolide resistance in group A streptococcal pharyngitis. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 735-6.
88. Yan SS, Fox ML, Holland SM, Stock F, Gill VJ, Fedorko DP. Resistance to multiple fluoroquinolones in a clinical isolate of *Streptococcus pyogenes*: identification of *gyrA* and *parC* and specification of point mutations associated with resistance. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 3196-8.
89. Biedenbach DJ, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Characterization of fluoroquinolone-resistant beta-hemolytic *Streptococcus* spp. isolated in North America and Europe including the first report of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 55: 119-27.
90. Richter SS, Diekema DJ, Heilmann KP, Almer LS, Shortridge VD, Zeitler R, Flamm RK, Doern GV. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pyogenes*. Clin Infect Dis 2003; 36: 380-3.

91. Reinert RR, Lütticken R, Al-Lahham A. High-level fluoroquinolone resistance in a clinical *Streptococcus pyogenes* isolate in Germany. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 659-62.
92. Malhotra-Kumar S, Van Heirstraeten L, Lammens C, Chapelle S, Goossens H. Emergence of high-level fluoroquinolone resistance in *emm6* *Streptococcus pyogenes* and in vitro resistance selection with ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin. J Antimicrob Chemother 2009; 63: 886-94.
93. Smeesters PR, Vergison A, Junior DC, Van Melderren L. Emerging fluoroquinolone-non-susceptible group A streptococci in two different paediatric populations. Int J Antimicrob Agents 2009; 34: 44-9.
94. Albertí S, Cortés G, García-Rey C, Rubio C, Baquero F, García-Rodríguez JA, Bouza E, Aguilar L. *Streptococcus pyogenes* pharyngeal isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Spain: mechanisms of resistance and clonal diversity. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 418-20.
95. Pires R, Ardanuy C, Rolo D, Morais A, Brito-Avô A, Gonçalo-Marques J, Liñares J, Santos-Sanches I. Emergence of ciprofloxacin-nonsusceptible *Streptococcus pyogenes* isolates from healthy children and pediatric patients in Portugal. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 2677-80.
96. Montes M, Tamayo E, Orden B, Larruskain J, Perez-Trallero E. Prevalence and clonal characterization of *Streptococcus pyogenes* clinical isolates with reduced fluoroquinolone susceptibility in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 93-7.
97. Billal DS, Hotomi M, Yan SS, Fedorko DP, Shimada J, Fujihara K, Yamanaka N. Loss of erythromycin resistance genes from strains of *Streptococcus pyogenes* that have developed resistance to levofloxacin. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 64: 225-8.
98. McGowan JE Jr, Gerding DN. Does antibiotic restriction prevent resistance?. New Horiz. 1996 Aug; 4(3): 370-6

99. Shlaes DM, Gerding DN, John JF Jr, Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA et al. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: Guidelines for the Prevention of Antimicrobial Resistance in Hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18:275-291
100. Owens RC Jr, Ambrose PG. Antimicrobial stewardship and the role of pharmacokinetics-pharmacodynamics in the modern antibiotic era. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007 Mar; 57(3 Suppl): 77S-83S
101. Aguilar L, Giménez MJ. Gaps in antibiotic development: the post-marketing task. *Rev Med Microbiol* 2008; 19:1-7
102. Drusano GL. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials. *Clin Infect Dis*. 2007 Jul 15; 45 Suppl 1: S89-95
103. Jacobs MR. Combining resistance: application of the emerging science of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Dec; 30 Suppl 2: S122-6
104. Jacobs MRE. How can we predict bacterial eradication? *Int J Infect Dis*. 2003 Mar; 7 Suppl 1:S13-20
105. Grau S, Alvarez-Lerma F, Dominguez-Gil A. Pharmacokinetic/pharmacodynamic indices: are we ready to use them in daily practice? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007 Dec; 5(6): 913-6
106. Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:391-408
107. Zeitlinger MA, Derendorf H, Mouton JW, Cars O, Craig WA, Andes D, Theuretzbacher U. Protein binding – do we ever learn?. *Antimicrob Agents Chemother* 2011 Jul; 55(7): 3067-74
108. Moellering RC, Eliopoulos GM. Principles of anti-infective therapy. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett Principles and*

Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005: 242-53

109. Olofsson SK, Cars O. Optimizing drug exposure to minimize selection of antibiotic resistance. Clin Infect Dis. 2007 Sept 1; 45 Supple 2: S129-36
110. Courvalin P. Can pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters provide dosing regimens that are less vulnerable to resistance? Clin Microbiol Infect 2008 Nov; 14(11): 989-94
111. Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, Martin B, Claverys JP. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. Science 2006 Jul 7; 313 (5783): 89-92
112. Wellington K, Curran MP. Cefditoren pivoxil: a review of its use in the treatment of bacterial infections. Drugs 2004; 64: 2597-2618
113. Yamada M, Watanabe T, Miyara T, et al. Crystal structure of cefditoren complexed with *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2X: structural basis for its high antimicrobial activity. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 45-50.
114. Sábada B, Azanza JP, Quetglas EG, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic serum and urine profile of cefditoren following single-dose and multiple twice- and thrice-daily regimens in healthy volunteers: a phase I study. Rev Esp Quimioter 2007; 20:51-60
115. Biedenbach DJ, Jones RN. Update of cefditoren activity tested against community-acquired pathogens associated with infections of the respiratory tract and skin and skin structures, including recent pharmacodynamic considerations. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009; 64: 202-12.
116. Fritsche TR, Biedenbach DJ, Jones RN. Update of the activity of cefditoren and comparator oral beta-lactam agents tested against community-acquired *Streptococcus pneumoniae* isolates (USA, 2004-2006). J Chemother. 2008; 20: 170-4.

117. Stefani S, Mezzatesta ML, Fadda G, Mattina R, Palù G, Rossano F, Tufano MA, Schito GC, Nicoletti G. Antibacterial activity of cefditoren against major community-acquired respiratory pathogens recently isolated in Italy. *J Chemother* 2008; 20: 561-9.
118. Tempera G, Furneri PM, Ferranti C, Genovese C, Ripa S, Ungheri S, Nicoletti G. In vitro activity of cefditoren versus other antibiotics against *S. pneumoniae* clinical strains isolated in Italy. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; 23: 833-40.
119. Tempera G, Furneri PM, Carlone NA, Cocuzza C, Rigoli R, Musumeci R, Pilloni AP, Prenna M, Tufano MA, Tullio V, Vitali LA, Nicoletti G. Antibiotic susceptibility of respiratory pathogens recently isolated in Italy: focus on cefditoren. *J Chemother* 2010; 22: 153-9.
120. Seral C, Suárez L, Rubio-Calvo C, Gómez-Lus R, Gimeno M, Coronel P, Durán E, Becerril R, Oca M, Castillo FJ. In vitro activity of cefditoren and other antimicrobial agents against 288 *Streptococcus pneumoniae* and 220 *Haemophilus influenzae* clinical strains isolated in Zaragoza, Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 62: 210-5.
121. Fenoll A, Giménez MJ, Robledo O, Coronel P, Gimeno M, Casal J, Aguilar L. Activity of cefditoren against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* showing non-susceptibility to penicillins, cephalosporins, macrolides, ketolides or quinolones. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 224-6.
122. Fenoll A, Aguilar L, Robledo O, Giménez MJ, Tarragó D, Granizo JJ, Gimeno M, Coronel P. Influence of the beta-lactam resistance phenotype on the cefuroxime versus cefditoren susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* recovered from children with acute otitis media. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 323-7.
123. Fenoll A, Giménez MJ, Robledo O, Aguilar L, Tarragó D, Granizo JJ, Martín-Herrero JE. Influence of penicillin/amoxicillin non-susceptibility on the activity of

third-generation cephalosporins against *Streptococcus pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27: 75-80.

124. Fenoll A, Giménez MJ, Robledo O, Aguilar L, Tarragó D, Granizo JJ, Gimeno M, Coronel P. In vitro activity of oral cephalosporins against pediatric isolates of *Streptococcus pneumoniae* non-susceptible to penicillin, amoxicillin or erythromycin. J Chemother 2008; 20: 175-9.
125. Kozlow RS, Sivaya OV, Shevelev AN. Perspective of new cephalosporins for treatment of pneumococcal infections. Pulmonology 2011; 3: 53-8
126. Soriano F, Granizo JJ, Fenoll A, Gracia M, Fernández-Roblas R, Esteban J, Gadea I, Coronel P, Gimeno M, Ródenas E, Santos F. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* isolated in four southern European countries (ARISE project) from adult patients: results from the cefditoren surveillance program. J Chemother 2003; 15: 107-12.
127. Fenoll A, Aguilar L, Giménez MJ, Vicioso MD, Robledo O, Granizo JJ, Coronel P. Susceptibility of recently collected Spanish pneumococci nonsusceptible to oral penicillin from serotypes not included in the 7-valent conjugate vaccine. Antimicrob Agents Chemother 2010;54: 2696-8.
128. Tarragó D, Aguilar L, García R, Gimenez MJ, Granizo JJ, Fenoll A. Evolution of clonal and susceptibility profiles of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* among invasive isolates from children in Spain (1990-2008). Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55: 2297-302.
129. Soriano F, Cafini F, Aguilar L, Tarragó D, Aloy L, Jiménez MJ, Gracia M, Ponte MC, Leu D, Pana M, Letowska I, Fenoll A. Breakthrough in penicillin resistance? *Streptococcus pneumoniae* isolates with penicillin/cefotaxime MICs of 16 mg/L and their genotypic and geographical relatedness. J Antimicrob Chemother 2008; 62: 1234-40.
130. Sevillano D, Giménez MJ, Cercenado E, Cafini F, Gené A, Alou L, Marco F, Martínez-Martínez L, Coronel P, Aguilar L. Genotypic versus phenotypic

characterization, with respect to beta-lactam susceptibility, of *Haemophilus influenzae* isolates exhibiting decreased susceptibility to beta-lactam resistance markers. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 267-70.

131. Gracia M, Díaz C, Coronel P, Gimeno M, García-Rodas R, del Prado G, Huelves L, Ruiz V, Naves PL, Ponte MC, Granizo JJ, Soriano F. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolates in eight Central, East and Baltic European countries in 2005-06: results of the Cefditoren Surveillance Study. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1180-1.
132. Harimaya A, Yokota S, Sato K, Himi T, Fujii N. Remarkably high prevalence of *ftsI* gene mutations in *Haemophilus influenzae* isolates from upper respiratory tract infections in children of the Sapporo district, Japan. *J Infect Chemother* 2008; 14: 223-7.
133. García-de-Lomas J, Lerma M, Cebrián L, Juan-Bañón JL, Coronel P, Giménez MJ, Aguilar L. Influence of *Haemophilus influenzae* beta-lactamase production and/or *ftsI* gene mutations on in vitro activity of and susceptibility rates to aminopenicillins and second- and third-generation cephalosporins. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30: 190-2.
134. Biedenbach DJ, Jones RN, Fritsche TR. Antimicrobial activity of cefditoren tested against contemporary (2004-2006) isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* responsible for community-acquired respiratory tract infections in the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 61: 240-4.
135. Gracia M, Díaz C, Coronel P, Gimeno M, García-Rodas R, Rodríguez-Cerrato V, del Prado G, Huelves L, Ruiz V, Naves PF, Ponte MC, Granizo JJ, Soriano F. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pyogenes* in Central, Eastern, and Baltic European Countries, 2005 to 2006: the cefditoren surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64: 52-6.

136. Casey JR, Pichichero ME. The evidence base for cephalosporin superiority over penicillin in streptococcal pharyngitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57(3 Suppl.): S39-45.
137. Casey JR, Pichichero ME. Meta-analysis of cephalosporins versus penicillin for treatment of group A streptococcal tonsillopharyngitis in adults. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1526-34.
138. Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Giménez MJ, González N, Torrico M, Cafini F, Fenoll A, Coronel P, Prieto J. High protein binding and cidal activity against penicillin-resistant *S. pneumoniae*: a cefditoren in vitro pharmacodynamic simulation. *PLoS One* 2008; 3(7): e2717.
139. Cafini F, Yuste J, Giménez MJ, Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Ramos-Sevillano E, Torrico M, González N, García E, Coronel P, Prieto J. Enhanced in vivo activity of cefditoren in pre-immunized mice against penicillin-resistant *S. pneumoniae* (serotypes 6B, 19F and 23F) in a sepsis model. *PLoS One* 2010; 5 (8): e12041.
140. Luján M, Gallego M, Belmonte Y, Fontanals D, Vallès J, Lisboa T, Rello J. Influence of pneumococcal serotype group on outcome in adults with bacteremic pneumonia. *Eur Respir J.* 2010;36: 1073-1079.
141. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998;26: 1-10.
142. Heffelfinger JD, Dowell SF, Jorgensen JH, Klugman KP, Mabry LR, Musher DM, Plouffe JF, Rakowsky A, Schuchat A, Whitney CG. Management of community-acquired pneumonia in the era of pneumococcal resistance: a report from the Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group. *Arch Intern Med* 2000; 160: 1399-1408.
143. Lodise TP, Kinzig-Schippers M, Drusano GL, Loos U, Vogel F, Bulitta J, Hinder M, Sörgel F. Use of population pharmacokinetic modeling and Monte Carlo simulation to describe the pharmacodynamic profile of cefditoren in plasma and epithelial lining fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1945-1951.

144. Food and Drug Administration. Spectracef prescribing information.
<http://www.crtx.com/docs/spectracef.pdf>
145. Granizo JJ, Sádaba B, Honorato J, Gimenez MJ, Sevillano D, Aguilar L, Coronel P. Monte Carlo simulation describing the pharmacodynamic profile of cefditoren in plasma from healthy volunteers. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31: 396-398.
146. Karlowsky JA, Jones ME, Draghi DC, Critchley IA, Thornsberry C, Sahm DF. In vitro susceptibility of recent clinical isolates of pneumococci to the investigational cephalosporin cefditoren. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42: 59-64.
147. Johnson DM, Biedenbach DJ, Beach ML, Pfaller MA, Jones RN. Antimicrobial activity and in vitro susceptibility test development for cefditoren against *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Streptococcus* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;37: 99-105.
148. Jones RN, Biedenbach DJ, Croco MA, Barrett MS. In vitro evaluation of a novel orally administered cephalosporin (Cefditoren) tested against 1249 recent clinical isolates of *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31: 573-578.
149. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.
<https://sinaem4.agemed.es/consaem/fichasTecnicas.do?metodo=detalleForm>
150. Brook I. The role of beta-lactamase producing bacteria and bacterial interference in streptococcal tonsillitis. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17: 439-442.
151. Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005: 2392-2411.
152. Murphy TF. *Haemophilus influenzae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005: 2661-2669.

153. Smith-Vaughan HC, Leach AJ, Shelby-James TM, Kemp K, Kemp DJ, Mathews JD. Carriage of multiple ribotypes of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* in aboriginal infants with otitis media. *Epidemiol Infect* 1996;116: 177-183.
154. Sá-Leão R, Nunes S, Brito-Avô A, Alves CR, Carriço JA, Saldanha J, Almeida JS, Santos-Sanches I, de Lencastre H. High rates of transmission of and colonization by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* within a day care center revealed in a longitudinal study. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 225-234.
155. Takahata S, Ida T, Senju N, Sanbongi Y, Miyata A, Maebashi K, Hoshiko S. Horizontal gene transfer of *ftsI*, encoding penicillin-binding protein 3, in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1589-1595.
156. González N, Aguilar L, Sevillano D, Giménez MJ, Alou L, Cafini F, Torrico M, López AM, Coronel P, Prieto J. Efficacy of simulated cefditoren versus amoxicillin-clavulanate free concentrations in countering intrastrain *ftsI* gene diffusion in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2788-2794.
157. González N, Aguilar L, Alou L, Giménez MJ, Sevillano D, Torrico M, Cafini F, Coronel P, Prieto J. Influence of different resistance traits on the competitive growth of *Haemophilus influenzae* in antibiotic-free medium and selection of resistant populations by different β -lactams: an in vitro pharmacodynamic approach. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 1215-1222.
158. Cafini F, Aguilar L, Sevillano D, Giménez MJ, Alou L, Fenoll A, Echevarría O, Torrico M, González N, Coronel P, Prieto J. Decrease in bacterial load versus resistance selection of pneumococcal subpopulations by β -lactam physiological concentrations over time: an in vitro pharmacodynamic simulation. *Microb Drug Resist* 2008; 14: 13-21.
159. Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Giménez MJ, González N, Torrico M, Cafini F, Coronel P, Prieto J. β -lactam effects on mixed cultures of common

respiratory isolates as an approach to treatment effects on nasopharyngeal bacterial population dynamics. PLoS One 2008; 3: e3846.

160. Granizo JJ, Giménez MJ, Barberán J, Coronel P, Gimeno M, Aguilar L. Efficacy of cefditoren in the treatment of upper respiratory tract infections: a pooled analysis of six clinical trials. Rev Esp Quimioter 2008; 21: 14-21.
161. Granizo JJ, Giménez MJ, Barberán J, Coronel P, Gimeno M, Aguilar L. The efficacy of cefditoren pivoxil in the treatment of lower respiratory tract infections, with a focus on the per-pathogen bacteriologic response in infections caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*: a pooled analysis of seven clinical trials. Clin Ther 2006; 28: 2061-2069.